

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA E DOS GENES DE
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM ESPÉCIES DO GÉNERO *SECALE*.**

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica

ELISABETE CRISTINA JESUS DOS SANTOS



VILA REAL, 2010

A orientadora:

Professora Catedrática Olinda Pinto-Carnide, UTAD

A co-orientadora:

Professora Auxiliar Maria Manuela Outeiro Matos, UTAD

Agradecimentos

Ao professor Catedrático Armando Mascarenhas Ferreira, Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço a possibilidade para realizar este Mestrado e as condições das instalações utilizadas para a sua realização.

Ao professor Catedrático António Fontaínhas Fernandes, presidente da Escola das Ciências da Vida e do Ambiente, agradeço a oportunidade para concretizar este mestrado nesta escola.

À coordenação do Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica, pela admissão neste projecto de Mestrado e a todos os professores pelos ensinamentos prestados.

À professora Catedrática Olinda Pinto-Carnide, directora do Departamento de Genética e Biotecnologia, por me ter dado um voto de confiança ao aceitar ser minha orientadora, permitindo-me realizar esta dissertação. Pela amizade e paciência demonstrada, pela receptividade, pelos vários ensinamentos, pelos conselhos, pelo incentivo de seguir sempre em frente e pela total dedicação a este trabalho.

À professora Doutora Manuela Matos, agradeço, igualmente, a oportunidade dada para elaborar esta dissertação, pela confiança depositada ao longo de todo este percurso, pela amizade, pelo esclarecimento de dúvidas, pela motivação, pela total disponibilidade e por todo o apoio e empenho.

À Maria João, pelo apoio constante, pela amizade, por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos, pelo optimismo que sempre me proporcionou, pela grande força que me deu.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Genética e Biotecnologia que me apoiaram neste percurso.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biotecnologia que, de certa forma, contribuíram para a elaboração desta dissertação.

Ao Nuno, pela paciência e compreensão, pela força e optimismo constantes, pelo apoio incondicional, por acreditar nas minhas capacidades e por estar sempre presente.

Às minhas meninas, Cátia, Raquel, Patrícia e Natália, pelo apoio incondicional, por terem contribuído de forma incansável na elaboração e formatação desta dissertação, pela grande amizade e por terem sido o meu ombro ao longo de todo este percurso.

Aos meus pais, por apoiarem sempre as minhas decisões e confiar nas minhas capacidades, pela preocupação e por proporcionarem o seguimento da minha carreira científica.

Ao meu irmão Ivan, pelo carinho e apoio, pela boa disposição e pelo companheirismo.

A toda a minha família, em especial a minha avó, que contribuíram para eu me tornar na pessoa que sou hoje.

A todos um Muito Obrigada!

Resumo

O centeio (*Secale cereale* L.) é uma cultura importante pela sua capacidade de resistir e tolerar diversos stresses bióticos e abióticos. A toxicidade do alumínio (Al) limita o crescimento e a produtividade das culturas em solos ácidos, sendo o maior factor limitante para o crescimento das plantas, numa grande área Mundial. Tem sido descrita uma grande variabilidade na tolerância ao Al, entre espécies diferentes e dentro da mesma espécie, nas mais variadas culturas. Entre os cereais, o centeio é considerada a espécie mais tolerante. O género *Secale* inclui várias espécies silvestres e uma única espécie cultivada (*S. cereale*). Vários estudos têm sido efectuados no centeio cultivado para determinar o grau de tolerância ao Al e para caracterizar a sua variabilidade. No que respeita às espécies silvestres é muito pouco conhecido o seu comportamento relativamente à tolerância ao Al. Sendo as espécies de *Secale*, na sua maioria, alogâmicas, existe uma grande diversidade de genótipos, o que favorece a selecção natural do germoplasma mais adequado às diferentes condições edafo-climáticas. Este facto torna o centeio de extrema importância para utilização em programas de melhoramento genético de espécies afins e economicamente importantes. Para avaliar a diversidade genética têm sido desenvolvidos marcadores moleculares que permitem estudar as relações filogenéticas através da análise do grau de polimorfismo que as espécies apresentam. Os mecanismos da tolerância ao Al são diversos e dependentes da espécie em causa. A exsudação dos ácidos orgânicos foi descrita como um dos mecanismos implicados na tolerância ao Al e ganhou maior destaque com a recente clonagem dos genes que codificam a exsudação do malato (*ALMT*) e do citrato (*MATE*), pelas raízes, activada pelo Al.

Neste trabalho, avaliou-se a resposta de cinco espécies/subespécies silvestres do género *Secale*, e quatro variedades/populações do centeio cultivado *S. cereale*. Foram utilizadas quatro testemunhas, duas sensíveis e duas tolerantes. Os resultados obtidos permitiram inferir da grande variabilidade existente na tolerância ao Al entre os vários genótipos de centeio estudados.

Estudou-se a variabilidade genética deste material vegetal através dos marcadores *RAPDs* e *ISSRs* e determinaram-se as relações filogenéticas. Foram encontrados 436 marcadores de *PCR* (243 *RAPDs* e 193 *ISSRs*) onde 294 se revelaram polimórficos. A

percentagem de polimorfismo detectada foi de 60,50 e 76,17 %, nos marcadores *RAPDs* e *ISSRs*, respectivamente. A análise dos resultados foi efectuada através do método UPGMA utilizando o coeficiente SM. A combinação destes marcadores originou um dendrograma no qual se agruparam onze centeios estudados. Com o objectivo de relacionar diferentes sequências com diferentes graus de tolerância foi iniciado um estudo de análise de sequências do gene *MATE*. Foram obtidas, a partir do gDNA, sequências de três exões do gene *MATE*, de plantas tolerantes e sensíveis das diferentes espécies, e verificou-se a existência de uma grande variabilidade.

Palavras-chave: *Secale cereale* L., toxicidade do alumínio, acidez dos solos, marcadores moleculares, variabilidade genética, *MATE*

Abstract

Rye (*Secale cereale* L.) is an important crop due to its ability to resist and tolerate biotic and abiotic stresses. Aluminum (Al) toxicity limits growth and crop yield in acid soils and is the main limiting factor for plant growth in most parts of the world. A large variability in Al tolerance has been described among different species and within the same species, in several crops. Among cereals, rye is the most tolerant species. The genus *Secale* includes several wild species and one cultivated species (*S. cereale*). Several studies have been carried out on cultivated rye to determine the Al tolerance degree and to characterize the variability, relatively to wild ryes, there is few information about its behavior to Al tolerance. The *Secale* species are mostly allogamous allowing a great diversity of genotypes, which support the natural selection of germplasm adapted to different soil and climatic conditions. Rye can be used as a source of resistance genes for related species, namely wheat. Therefore, the knowledge of the mechanism and the genes that control Al tolerance in rye will provide fundamental information than can be used to increase Al tolerance in other cereals.

To assess the genetic diversity, molecular markers have been developed to enable the study of phylogenetic relationships using the species polymorphism degree. There are several Al tolerance mechanisms described in different species. The mechanism that has been observed most commonly involves the release of organic anions such as malate, citrate, and oxalate from roots. A role for organic acid exudation as a mechanism of Al tolerance has been highlighted by the recent cloning of Al-tolerance genes that all encode organic acid transporters of malate (*ALMT1*) and citrate (*MATE*).

In this study, five wild species/subspecies of the genus *Secale* and four varieties/populations of the cultivated rye, *S. cereale*, compared with four testers (two sensitive and two tolerant) were evaluated. The results showed a large variability of Al tolerance among the various genotypes of rye studied.

We studied the genetic variability of plant material using RAPD and ISSR markers, for determination of the phylogenetic relationships. 436 PCR markers (243 RAPDs and 193 ISSRs) were found being 294 polymorphic. The percentage of polymorphism detected was 60,50 and 70,17 % in RAPDs and ISSRs markers, respectively. The analysis was done with the UPGMA method using the SM coefficient. The combination of these markers produced a dendrogram grouping the eleven studied ryes .

In order to relate different sequences with different tolerance degrees, a sequence analysis of *MATE* gene was initiated. Three exons sequences of the MATE gene were obtained from gDNA sequences of tolerant and sensitive plants of different species. It was found a great variability.

Keywords: *Secale cereale* L., aluminum toxicity, soil acidity, molecular markers, genetic variability, *MATE*

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius

% – Percentagem

µL – Microlitros

AACT1 – *Aluminum-Activated Citrate Transporter*

a.C. – antes de Cristo

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

Al – Alumínio

AlCl₃.6H₂O – Cloreto de Alumínio (Hexahidrato)

ALMT1 – *Al-activated malate transporter 1*

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

ddH₂O – *double distilled water*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfatos

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

EtBr – Brometo de Etídio

FAO – *Food and Agriculture Organization*

g – gramas

gDNA – DNA genómico

GRIN – *Germplasm Resources Information Network*

h – horas

INDEL – Inserção - Delecção

INE – Instituto Nacional de Estatística

ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*

ITS – *Internal Transcribed Spacers*

KNO₃ – Nitrato de Potássio

L – Litro

LB – *Loading Buffer*

LDL – *Low-Density Lipoprotein*

M – Molar

MATE – *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

mg – Miligramas

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de Magnésio (Hexahidrato)
 min – Minutos
 mL – Mililitro
 mM – Milimolar
 mm – milímetro
 ng – Nanogramas
 NH_4NO_3 – Nitrato de Amónio
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sulfato de Amónio
 nm – Nanómetros
 NTsys-pc – *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for Personal Computer*
 pb – Pares de base
 PCR – *Polymerase Chain Reaction*
 ppm – Partes por milhão
 RAPD – *Random Amplification of Polymorphic DNA*
 RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 RNA – *Ribonucleic Acid*
 rpm – Rotações por minuto
 s – Segundos
 SAHN – *Sequential Agglomerative Hierarchical Nested*
 SIMQUAL – *Similarity of Qualitative data*
 SM – *Simple Matching*
 SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*
 SSR – *Simple Sequence Repeats*
 STS – *Sequence-Tagged-Site*
 Taq – *Thermus aquaticus*
 TBE – Tris Borato EDTA
 U – Unidades
 UBC – University of British Columbia
 UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
 UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*
 UV – Ultra Violeta
 V – Volts

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O CENTEIO	1
1.1.1- TAXONOMIA.....	1
1.1.2- ORIGEM DO CENTEIO CULTIVADO.....	5
1.1.3- MORFOLOGIA E CITOLOGIA	7
1.1.4- DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÉNERO <i>SECALE</i>	8
1.1.5- IMPORTÂNCIA ECONÓMICA.....	10
1.1.6- BENEFÍCIOS A NÍVEL DE SAÚDE	13
1.2- O CENTEIO E A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO	13
1.2.1- ACIDEZ DOS SOLOS.....	13
1.2.2- O ALUMÍNIO.....	17
1.2.3- TOXICIDADE DO ALUMÍNIO.....	18
1.2.4- MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO.....	20
1.2.5- CONTROLO GENÉTICO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO.....	23
1.3- MARCADORES MOLECULARES.....	25
2- OBJECTIVOS.....	31
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1- MATERIAL VEGETAL	32
3.2- METODOLOGIA.....	33
3.2.1- TESTE DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO.....	33
3.2.2- EXTRACÇÃO DE DNA DE FOLHAS	36
3.2.3- ANÁLISE DA QUANTIDADE E DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO	37
3.2.4- MARCADORES MOLECULARES	39
3.2.5- SEQUENCIAÇÃO DO GENE <i>A ACT1</i>	42
3.3- ANÁLISE DE RESULTADOS	45
4- ANÁLISE DE RESULTADOS	47
4.1- TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO.....	47
4.2- MARCADORES MOLECULARES	50
4.2.1- RAPDs (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA)	50
4.2.2- ISSRs (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS)	53
4.2.3- ANÁLISE FILOGENÉTICA	56
4.3- ANÁLISE DOS EXÕES DO GENE <i>A ACT1 (MATE1)</i>	58
5- DISCUSSÃO.....	61
5.1- TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO.....	61
5.2- MARCADORES MOLECULARES	66
5.2.1- POLIMORFISMO DOS MARCADORES MOLECULARES	68
5.2.2- ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	72
5.3- ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE <i>A ACT1 (MATE1)</i>	76
6- CONCLUSÕES	77
7- BIBLIOGRAFIA.....	79

Índice de Figuras

FIGURA 1.1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÉNERO <i>SECALE</i>	9
FIGURA 1.2: PRODUÇÃO DE CENTEIO EM VÁRIOS PAÍSES, EM 2007	11
FIGURA 1.3: ÁREA (A) E PRODUÇÃO (B) DE CENTEIO EM PORTUGAL REPRESENTADO POR REGIÃO	12
FIGURA 1.4: ÁREA (HA), PRODUÇÃO (T) E PRODUTIVIDADE (KG/HA) DE CENTEIO EM PORTUGAL	12
FIGURA 1.5: DISTRIBUIÇÃO DOS SOLOS ÁCIDOS A NÍVEL MUNDIAL	15
FIGURA 1.6: DISTRIBUIÇÃO DO pH DOS SOLOS EM PORTUGAL CONTINENTAL	15
FIGURA 3.1: GRÃOS DE CENTEIO A GERMINAR EM PLACAS DE PETRI.....	34
FIGURA 3.2: PLÂNTULAS NAS ESTRUTURAS COLOCADAS EM TABULEIROS COM A SOLUÇÃO NUTRITIVA	35
FIGURA 3.3: COLORAÇÃO DAS RAÍZES DAS PLÂNTULAS	35
FIGURA 3.4: PLÂNTULAS TOLERANTE E SENSÍVEL AO ALUMÍNIO.....	35
FIGURA 3.5: KIT UTILIZADO PARA EXTRACÇÃO DE DNA	36
FIGURA 3.6: QUANTIFICAÇÃO DE DNA EFECTUADA NO NANODROP®.....	38
FIGURA 3.7: ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE	38
FIGURA 3.8: SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE IMAGEM.....	39
FIGURA 3.9: TERMOCICLADOR UTILIZADO NAS REACÇÕES DE <i>RAPDs</i> E <i>ISSRs</i>	40
FIGURA 3.10: MARCADOR DE PESO MOLECULAR PADRÃO DE DNA	41
FIGURA 3.11: TERMOCICLADOR USADO NO <i>PCR-MATE1</i>	43
FIGURA 3.12: KIT DE PURIFICAÇÃO UTILIZADO.	44
FIGURA 4.1: MÉDIA DOS COMPRIMENTOS RADICULARES DOS GENÓTIPOS DE CENTEIO.....	47
FIGURA 4.2: MÉDIA DOS RECRESCIMENTOS RADICULARES DOS GEÓTIPOS DE CENTEIO	48
FIGURA 4.3: FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS NOS 13 CENTEIOS COM O PRIMER <i>OPA17</i>	52
FIGURA 4.4: FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS NOS 13 CENTEIOS COM O PRIMER <i>OPB10</i>	52
FIGURA 4.5: FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS NOS 13 CENTEIOS COM O PRIMER <i>UBC811</i>	55
FIGURA 4.6: FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS NOS 13 CENTEIOS COM O PRIMER <i>UBC836</i>	55
FIGURA 4.7: DENDROGRAMA COM AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS TREZE CENTEIOS EM ESTUDO COM BASE NOS MARCADORES <i>RAPDs</i> APLICANDO O MÉTODO UPGMA E O COEFICIENTE SM	56
FIGURA 4.8: DENDROGRAMA COM AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS TREZE CENTEIOS EM ESTUDO COM BASE NOS MARCADORES <i>ISSRs</i> APLICANDO O MÉTODO UPGMA E O COEFICIENTE SM.....	57
FIGURA 4.9: DENDROGRAMA COM AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS TREZE CENTEIOS EM ESTUDO COM BASE NA UNIÃO DOS MARCADORES <i>ISSRs</i> E <i>RAPDs</i> APLICANDO O MÉTODO UPGMA E O COEFICIENTE SM	57
FIGURA 4.10: PARTE DE UM ALINHAMENTO OBTIDO COM O EXÃO 4..... ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.	

Índice de Quadros

QUADRO 1.1: ÁCIDOS ORGÂNICOS EXSUDADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS.....	22
QUADRO 3.1: CÓDIGO DOS CENTEIOS EM ESTUDO	33
QUADRO 3.2: SEQUÊNCIAS DOS 26 <i>PRIMERS</i> TESTADOS NA ANÁLISE DE <i>RAPD</i>	40
QUADRO 3.3: SEQUÊNCIAS DOS 18 <i>PRIMERS</i> TESTADOS NA ANÁLISE DE <i>ISSR</i>	42
QUADRO 3.4: SEQUÊNCIAS DE <i>PRIMERS</i> USADOS NAS <i>PCR-AACT1</i> E TAMANHO ESPERADO DAS BANDAS ..	43
QUADRO 4.1: NÚMERO E PERCENTAGEM DE PLANTAS TESTADAS COM E SEM RECRESCEMENTOS.....	49
QUADRO 4.2: RESULTADOS DA AMPLIFICAÇÃO E DO POLIMORFISMO DE CADA <i>PRIMER</i> DE <i>RAPD</i> SELECCIONADO	51
QUADRO 4.3: BANDAS ÚNICAS OBTIDAS EM CADA ESPÉCIE ATRAVÉS DOS MARCADORES <i>RAPDs</i>	51
QUADRO 4.4: RESULTADOS DA AMPLIFICAÇÃO E DO POLIMORFISMO DE CADA <i>PRIMER</i> DE <i>ISSR</i> SELECCIONADO	54
QUADRO 4.5: BANDAS ÚNICAS OBTIDAS EM CADA ESPÉCIE ATRAVÉS DOS MARCADORES <i>ISSRs</i>	54
QUADRO 4.6: ANÁLISE UTILIZANDO TODOS OS DADOS	59
QUADRO 4.7: ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS CULTIVARES DE <i>S. CEREALE</i>	59
QUADRO 4.8: ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GÊNERO <i>SECALE</i>	60

1- Introdução

1.1- O Centeio

1.1.1- Taxonomia

O centeio, *Secale cereale* L., insere-se na Família *Poaceae* (*Gramineae*), sub-Família *Pooideae*, Tribo *Triticeae*, sub-Tribo *Triticineae* e Género *Secale* (Pinto-Carnide, 1990; GRIN, 2010, <http://www.ars-grin.gov>). Para além disso, o centeio está inserido na Divisão *Magnoliophyta* e na Classe *Liliopsida*, fazendo parte, portanto, das plantas angiospérmicas e monocotiledóneas.

A família das gramíneas, *Poaceae*, encontra-se subdividida em mais de 40 tribos formando uma das famílias mais vastas consistindo em cerca de 610 géneros e 10000 espécies. Os membros desta família surgem com abundância em todas as regiões climáticas. O arroz, o trigo, o milho painço e o centeio fazem parte da base da dieta diária de milhões de pessoas, enquanto outros cereais como o milho ou a cevada são intensivamente usados na produção animal. Os grãos dos cereais compõem a matéria-prima para produtos de fermentação e destilação alcoólica como a cerveja e o whisky, respectivamente. O milho é um precioso recurso de óleo; a cana-de-açúcar tem grande importância no comércio internacional, enquanto outros membros da família *Poaceae* como os bambus são amplamente utilizados como material de construção (Langer e Hill, 1991).

Triticeae é o nome científico dado à tribo das gramíneas que inclui os seguintes cereais para além do centeio: o trigo (*Triticum aestivum* e *Triticum durum*), a cevada (*Hordeum vulgare*), o triticales (*xTriticosecale* Wittmack) e cerca de outras 350 espécies incluindo espécies afins dos géneros *Aegilops*, *Agropyron*, *Haynaldia* e *Elymus* (Pinto-Carnide, 1990; Barkworth e Bothmer, 2009). A taxonomia e a nomenclatura da tribo *Triticeae* têm vindo a sofrer grandes alterações não havendo um consenso geral quanto ao número de géneros que ela inclui (Pinto-Carnide, 1990).

Uma série de análises filogenéticas confirmaram a monofilia entre a tribo *Triticeae* e o género *Secale* (Petersen *et al.*, 2004). Este género, apesar de ser pequeno, tem um peso relevante dentro da tribo *Triticeae* (Akhavan *et al.*, 2009).

O género *Secale* inclui espécies perenes e anuais, com autofecundação (auto-compatíveis) ou polinização cruzada (auto-incompatíveis), assim como espécies selvagens ou cultivadas (Vences *et al.*, 1987). A maioria dos taxa são alogâmicos (Chikmawati *et al.*, 2006), ou seja, são auto-incompatíveis reproduzindo-se por polinização cruzada. Por este facto, é extremamente difícil manter cultivares de centeio geneticamente puros (Bushuk, 2001).

A taxonomia do género *Secale* continua incerta apesar do grande número de estudos realizados, havendo muita controvérsia ao longo dos anos. Dependendo do critério usado foram, até agora, reconhecidas entre 3 e 14 espécies dentro do género *Secale* (GRIN, 2010, <http://www.ars-grin.gov>).

Os primeiros estudos sobre a sistemática do género *Secale* foram efectuados por Vavilov (1917,1926), baseando-se nas características morfológicas, no ciclo de vida e na distribuição geográfica. Este autor identificou 4 espécies: *Secale africanum* Stapf., *Secale cereale* L., *Secale fragile* Marsch. e *Secale montanum* Guss.

Pouco tempo depois, Zhukovsky (1928) propôs 3 subespécies para a espécie *Secale cereale* L.: a subespécie *cereale* Zhuk. para o centeio cultivado e as subespécies *segetale* e *ancestrale* Zhuk. para o centeio silvestre. Em 1933, a subespécie *S. ancestrale* foi considerada, pelo mesmo autor, uma nova espécie.

Com base na viabilidade do cruzamento entre as espécies, Roshevitz (1947) conseguiu distinguir cerca de 14 espécies e classificou-as em três séries principais: *Cerealia*, *Kuprijanovia* e *Silvestria*. A primeira série incluía o centeio cultivado, *S. cereale*, e todas as formas silvestres anuais relacionadas (*S. afghanicum* Vav., *S. ancestrale*, *S. dighoricum* Vav., *S. segetale* e *S. vavilovii* Grossh.). Todos os membros desta série continham três cromossomas translocados. A segunda série englobava todas as espécies perenes (*S. africanum*, *S. anatolicum* Boiss., *S. ciliatoglume* Boiss., *S. dalmaticum* Vis., *S. daralagesi* Thum., *S. kuprijanovii* Grossh., *S. montanum*) enquanto a última série incluía apenas a espécie anual *S. sylvestre* Host. (sin. de *S. fragile* Marsch.).

Khush e Stebbins (1961) levaram a cabo uma série de estudos citogenéticos e demonstraram que os cromossomas do *S. cereale* diferem do *S. sylvestre* por três translocações recíprocas estando duas delas também presentes entre o *S. montanum* e o *S. cereale*. Assim sendo, o *S. montanum* e o *S. sylvestre* diferem somente numa pequena translocação. Portanto, citogeneticamente, os membros da série *Cerealia* Rosh.

encontram-se mais próximos dos membros da série *Kuprijanovia* Rosh. existindo uma relação próxima entre estes últimos e o *S. sylvestre*.

Com base nestes resultados, Khush (1962) propôs que os centeios perenes, *S. africanum*, *S. kuprijanovii* e *S. montanum* fossem considerados da mesma espécie, pelo facto de não ter encontrado qualquer apoio citogenético para tal, mas sim como subespécies do *S. montanum*. Além disto, também propôs que, as espécies silvestres anuais relacionadas com o *S. cereale* (*S. afghanicum*, *S. ancestrale*, *S. dighoricum* e *S. segetale*) fossem consideradas como subespécies desta, tal como constatou Zhukovsky (1928). Segundo Khush (1962), estas formas cruzam-se facilmente com o centeiro cultivado, os híbridos são vigorosos, as meioses são completamente normais e a fertilidade do pólen é tão elevada como a da unidade taxonómica parental.

Um ano mais tarde, Khush (1963) reconheceu 5 espécies e dividiu-as em duas secções com base na viabilidade do cruzamento, morfologia e emparelhamento cromossómico. Na primeira secção introduziu o centeiro anual *S. sylvestre* e, na segunda secção, as restantes espécies férteis entre elas *S. africanum*, *S. cereale*, *S. montanum* e *S. vavilovii*.

Através de abordagens quimiotaxonómicas, Dedio *et al.* (1969) indicaram que o *S. sylvestre* estaria mais próximo da série *Cerealina* Rosh., contrariando assim Roshevitz (1947) e Khush e Stebbins (1961) que indicaram os membros da série *Cerealina* Rosh. mais similares aos da série *Kuprijanovia* Rosh. do que ao *S. sylvestre* da série *Silvestria*.

Por sua vez, Zohary (1971) dividiu o género *Secale* em apenas dois grupos, o *Montanum* e o *Cerealina*, separando assim os centeios perenes dos anuais com formas selvagens e cultivadas. Assim sendo, acaba por juntar a espécie *S. sylvestre* à série *Cerealina* Rosh. reforçando a abordagem de Dedio *et al.* (1969).

Com base em estudos citológicos, ecológicos e morfológicos, Stutz (1972) considerou 4 a 12 espécies dependendo do critério usado para a definição de espécie e uniu-as em dois grupos principais, Anuais e Perenes. Mais uma vez, os membros da série *Cerealina* Rosh. foram agrupados com a espécie *S. sylvestre*.

Sencer (1975 citado por Chikmawati *et al.*, 2006) reconheceu 3 espécies biológicas dentro do género *Secale*: o *S. cereale*, o *S. montanum* e o *S. sylvestre*. A primeira espécie inclui os centeios anuais quer cultivados quer silvestres, a segunda abrange todos os centeios perenes silvestres, com elevada semelhança morfológica e afinidade citogenética e a terceira compreende apenas uma espécie anual silvestre, o *S. sylvestre*,

que se encontra geograficamente, ecologicamente e reprodutivamente isolada do *S. montanum*.

Utilizando isoenzimas, Vences *et al.* (1987) não encontraram uma diferenciação clara entre o *S. cereale* e o *S. montanum*, ambos se apresentaram relativamente próximos e geneticamente semelhantes. Segundo os mesmos autores, o *S. sylvestre* distinguiu-se do *S. vavilovii* e ambos se distinguiram das duas espécies alogâmicas. Mais tarde, Hammer (1990), suportando Vences *et al.* (1987), dividiu o género em 4 espécies: as espécies anuais e autogâmicas *S. sylvestre* e *S. vavilovii*, o alogâmico anual *S. cereale* e o perene *S. strictum* Presl. (sin. de *S. montanum* Guss.).

Através de dados moleculares, utilizando o *spacer-length variation* do rDNA, Reddy *et al.* (1990) demonstraram que o centeio anual *S. sylvestre* aparecia isolado em relação aos restantes taxa, ou seja, o que mostrou ser realmente distinto. O centeio cultivado revelou-se similar aos centeios silvestres anuais e perenes, demonstrando que é difícil separar o *S. cereale* do *S. strictum*. Esta separação do *S. sylvestre* é consistente com a classificação proposta para o género *Secale* por Khush (1963).

Na revisão taxonómica do género *Secale*, efectuado por Frederiksen e Petersen, em 1998, foram consideradas apenas três espécies (*S. cereale*, *S. strictum* e *S. sylvestre*) e cinco subespécies (*S. cereale* subps. *cereale* e subps. *ancestrale* e *S. strictum* subps. *strictum* e subps. *africanum*) (Frederiksen e Petersen, 1998).

Mais recentemente, Chikmawati *et al.* (2005) através de AFLPs obtiveram resultados que suportam o agrupamento feito pelo Stutz (1972) e que são consistentes com as considerações efectuadas por Frederiksen e Petersen (1998).

De acordo com o sistema de taxonomia adoptado pela “American Germplasm Resources Information Network” (GRIN, 2010, <http://www.ars-grin.gov>), o género *Secale* é actualmente reconhecido com 4 espécies: o anual alogâmico *S. cereale* L., os anuais autogâmicos *S. sylvestre* Host. (sin. de *S. fragile* Marsch.) e *S. vavilovii* Grossh. (sin. de *S. iranicum* Kobyl.) e o perene alogâmico *S. strictum* Presl. (sin. de *S. montanum* Guss.). Existem 8 subespécies no *S. cereale*: subsp. *afghanicum* (Vavilov) K. Hammer, subsp. *ancestrale* Zhuk., subsp. *cereale* (o único centeio cultivado), subsp. *dighoricum* Vavilov, subsp. *rigidum* Vavilov & Antropov (sin. de *S. turkestanicum* Bensin), subsp. *segetale* Zhuk., subsp. *tetraploidum* Kobyl. e subsp. *tsitsinii* Kobyl.; e 5 subespécies no *S. strictum*: subsp. *africanum* (Stapf) K. Hammer (ao contrário dos membros deste grupo é autogâmica), subsp. *anatolicum* (Boiss.) K. Hammer, subsp.

ciliatoglume (Boiss.) K. Hammer, subsp. *kuprijanovii* (Grossh.) K. Hammer e subsp. *strictum* (sin. de *S. montanum* Guss.).

As várias classificações obtidas ao longo dos anos resultam da diversidade de técnicas utilizadas na análise filogenética. Inicialmente, foram usados dados morfológicos, ecológicos e citogenéticos (por ex. Vavilov, 1926; Roshevitz, 1947 e Stutz, 1972). Dedio *et al.* (1969) utilizaram a química analítica de cromatografia em camada fina de compostos fluorescentes. Nos últimos anos, as relações filogenéticas dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes têm sido analisadas através de dados moleculares incluindo marcadores bioquímicos como as isoenzimas (Matos *et al.*, 2001) e marcadores genéticos como os *ISSRs* – *Inter Simple Sequence Repeat* (Matos *et al.*, 2001), *RAPDs* – *Random Amplification of Polymorphic DNA* (Del Pozo *et al.*, 1995; Matos *et al.*, 2001; Persson *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004), os *RFLPs* – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Petersen e Doebley, 1993, Loarce *et al.*, 1996), os *SSRs* – *Simple Sequence Repeats* (Shang *et al.*, 2006; Akhavan *et al.*, 2009) e os *AFLPs* – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Chikmawati *et al.*, 2005). Além disso, também foram analisadas o *spacer-length variation* do DNA ribossomal (Reddy *et al.*, 1990), as sequências ITS – *internal transcribed spacers* (De Bustos e Jouve, 2002), a presença e a distribuição de diferentes sequências de DNA repetitivo (Cuadrado e Jouve, 2002).

1.1.2- Origem do centeio cultivado

É do consenso geral que as variedades cultivadas de centeio se originaram a partir das formas selvagens após o seu transporte, como infestantes, com o trigo e a cevada, para as regiões do Norte de elevadas altitudes. As condições rigorosas destas regiões, mais favoráveis ao centeio do que ao trigo e à cevada, permitiram que o centeio selvagem se viesse a instalar como cultura principal e independente (Pinto-Carnide, 1990). Parece assim, que os centeios infestantes do Sudoeste Asiático e da Ásia Central serão os progenitores do centeio cultivado (Vavilov 1917, 1926).

A origem exacta do cultivo do centeio é desconhecida. No entanto, sabe-se que há 6000 anos o centeio estava a ser cultivado em vários locais na área principal da Turquia, no Noroeste do Irão e na Arménia (Evans, 1995 citado por Hancock, 2004). Pelo facto de não se ter encontrado qualquer vestígio do *S. cereale* nos antigos materiais

arqueológicos, considera-se que a sua origem é relativamente recente (Idade do Bronze) (Cuadrado e Jouve, 2002).

O centeio foi introduzido na Europa, possivelmente, entre 2000 e 2500 anos a. C. por duas vias: através do Norte do Cáucaso e através da Ásia Central (Khush, 1962).

Muitas foram as espécies do género *Secale* que, em diversas alturas, foram sugeridas como o antecessor imediato do *S. cereale*. Como se pode verificar pelos estudos taxonómicos, são várias as abordagens efectuadas para explicar a filogenia do género *Secale* e, consequentemente, chegar a um consenso relativamente à descendência do *S. cereale*. Vavilov (1926) e Roshevitz (1947) consideraram que o *S. vavilovii* evoluiu a partir do *S. montanum* e que era o antecessor imediato do *S. cereale*. Zukhovsky (1933) sugeriu que o *S. cereale* derivou do *S. ancestrale* e que este e o *S. montanum* divergiram de um ancestral comum. Dedio *et al.* (1969) apontaram o *S. sylvestre* como o antecessor do centeio cultivado. Khush e Stebbins (1961) e Zohary (1971) concluíram que o *S. cereale* derivou directamente do *S. montanum*. Segundo Khush (1962) o *S. sylvestre* diferenciou-se do *S. montanum* muito mais cedo do que as outras espécies e o *S. cereale* subs. *segetale* seria o antecessor imediato das centeios cultivados. Stutz (1972) apresentou evidências de que o *S. cereale* não podia ter derivado directamente do *S. montanum*, sugerindo ainda que se tinha originado da introgressão do *S. montanum* no *S. vavilovii*. Este, por sua vez, tinha derivado do *S. sylvestre* que deve ter evoluído do *S. montanum* ou de um ancestral comum.

Mais recentemente, Vences *et al.* (1987) voltaram a apontar o *S. montanum* como o antecessor directo das outras três espécies. Contrariamente, a maioria dos estudos moleculares provaram que o *S. sylvestre* é a espécie mais antiga (Reddy *et al.*, 1990; Del Pozo *et al.*, 1995; Shang *et al.*, 2006). De Bustos e Jouve (2002) referem que o *S. sylvestre* surgiu provavelmente a partir de espécies antigas como o *S. montanum*, surgindo depois o *S. africanum* que evoluiu num habitat diferente e que, por outro lado, o *S. vavilovii* e o *S. cereale* se diferenciaram do *S. montanum* produzindo formas que actualmente evoluem independentemente.

De uma forma geral, o *S. montanum* foi a espécie que obteve um maior consenso entre os diversos autores como sendo o antecessor do *S. cereale* e das restantes espécies.

1.1.3- Morfologia e citologia

Um elevado nível de variações morfológicas causaram muitas complexidades taxonómicas nas espécies, o que resultou nas diversas classificações efectuadas ao longo dos anos (Akhavan *et al.*, 2009).

Como já foi referido, o género *Secale* inclui centeios perenes, como é o caso do *S. montanum* e das suas respectivas subespécies, e centeios anuais como as espécies *S. cereale* (e respectivas subespécies), *S. vavilovii* e *S. sylvestre*.

As plantas jovens de centeio assemelham-se ao trigo, exceptuando o facto das aurículas serem pequenas, estreitas, sem pilosidade e de murcharem após algum tempo (Langer e Hill, 1991). A bainha e o limbo da parte inferior das folhas têm um pouco de pilosidade e, por vezes, consegue-se observar uma camada fina de cera, especialmente à volta dos nós (Chikmawati *et al.*, 2006). Os colmos são longos, esguios e rijos. A inflorescência é uma espiga que suporta uma única espiguetas em cada nó (Langer e Hill, 1991).

Cada espiguetas é constituída por um par de glumas pontiagudas e bastante estreitas e, geralmente, por três flores. Duas flores são hermafroditas e a terceira é estéril e não se desenvolve (Langer e Hill, 1991; Chikmawati *et al.*, 2006). As flores férteis contêm um lema em forma de quilha que é finalizado numa arista forte e numa pequena pálea em forma de barco (Langer e Hill, 1991). A espécie *S. sylvestre* distingue-se, morfológicamente, dos outros *taxa* por conter aristas muito maiores e grãos de pólen esféricos, pois nas outras espécies estes são ovóides (Frederiksen e Petersen, 1997).

Pelo facto da maioria dos centeios serem alogâmicos, possuem anteras bastante longas (5-14 mm) (Chikmawati *et al.*, 2006). O rendimento da planta depende, entre outros factores, da polinização efectiva do vento (Zohary e Hopf, 2000). O estigma do centeio permanece receptivo após algum tempo funcional, ocorrendo depois a polinização cruzada, característica que o distingue das espécies autogâmicas (Langer e Hill, 1991).

Quando a cariopse incha, força o lema e a pálea a afastarem-se e então, torna-se visível a partir do exterior. Quando está madura, assemelha-se a um grão de trigo excepto por ser mais delgado e por ter uma crista dorsal distinta (Langer e Hill, 1991).

A maioria dos centeios é semeada no Outono e são geralmente chamados de “centeios de inverno”. Devido à sua adaptação às condições de inverno frio e rigoroso, o centeio pode crescer com sucesso em áreas onde o clima é demasiado severo para a

cevada e para o trigo. Ma *et al.* (2004) conseguiram separar os “centeios de inverno” dos “centeios de primavera” através de marcadores moleculares.

Todos os *taxa* do género *Secale* são diplóides com 14 cromossomas ($2n=2x=14$) (Pinto-Carnide 1990; Bushuk, 2001; Cuadrado e Jouve, 2002) e podem ser intercruzados para produzir híbridos parcialmente férteis (Cuadrado e Jouve, 2002), sendo o seu genoma designado de R (Wang *et al.*, 1996). No entanto, são conhecidos alguns cultivares tetraplóides no centeio cultivado (*S. cereale* L.) (Chikmawati *et al.*, 2006), tendo sido produzidas artificialmente ($2n=4x=28$) (Pinto-Carnide, 1990; Bushuk, 2001).

A morfologia dos sete cromossomas encontra-se bem conservada em todo o género (à excepção do complexo *S. strictum*): um cromossoma satelífero (1R), três metacêntricos (2R, 3R e 7R) e três submetacêntricos (4R, 5R e 6R) (Cuadrado e Jouve, 2002).

O género *Secale*, à excepção da espécie *S. sylvestre*, é caracterizado por possuir cromossomas com grandes bandas heterocromáticas teloméricas e um elevado número de bandas intersticiais fracas (Chikmawati *et al.*, 2006). Esta espécie também se destacou por ser diferente dos restantes *taxa* pois contém uma quantidade muito inferior de sequências de DNA repetitivo tal como a outra espécie autogâmica anual, *S. vavilovii* (Cuadrado e Jouve, 1997). Dentro deste género foram confirmadas, através de análises meióticas, cerca de três translocações envolvendo diferentes braços cromossómicos, pelo que se encontram diferenças entre os cariótipos de alguns *taxa* (Khush e Stebbins, 1961; Khush, 1962). Pensa-se, portanto, que as mudanças estruturais nos cromossomas tiveram um papel importante na especiação (Stutz, 1972).

1.1.4- Distribuição geográfica do género *Secale*

O género *Secale* é um típico representante da flora Mediterrânica. Possui uma vasta distribuição desde a Europa Central e o Mediterrâneo Ocidental através dos Balcãs, Anatólia, Israel e Cáucaso até à Ásia Central, com uma população isolada na África do Sul (Sencer e Hawkes, 1980) (Figura 1.1).

O centeio cultivado (*S. cereale*) e os centeios anuais silvestres relacionados são geralmente encontrados em espaços abertos e em campos de cereais no Sudoeste e Centro Asiático (De Bustos e Jouve, 2002).

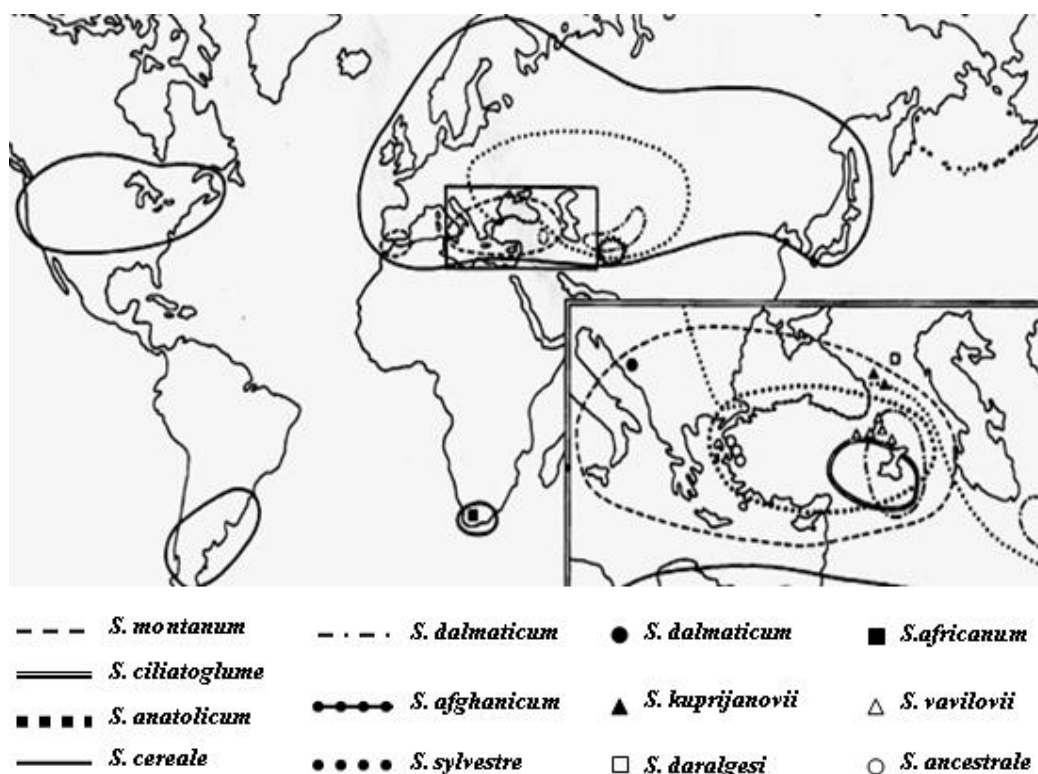


Figura 1.1: Distribuição geográfica do gênero *Secale* (Adaptado de Chikmawati *et al.*, 2006)

O *S. vavilovii* cresce como infestante em solos arenosos junto do rio Aras, nas encostas mais baixas das montanhas e nos campos cultivados da Arménia e da Turquia Oriental (De Bustos e Jouve, 2002; Chikmawati *et al.*, 2006).

A distribuição do *S. sylvestre* abrange uma área que inclui a Europa de Leste, o Cáucaso e a Ásia Central em solos arenosos, dunas e à beira-mar (Chikmawati *et al.*, 2006). Por sua vez, o *S. montanum* e as espécies perenes relacionadas encontram-se bem adaptadas a encostas secas, rochosas e pedregosas, daí o nome vulgar de “centeio da montanha” (Oram, 1996). Este é um grupo complexo que inclui espécies isoladas geograficamente distintas, como é o caso da subsp. *africanum* que é endémica do Sudoeste Asiático (Cuadrado e Jouve, 2002). De uma forma geral, este grupo encontra-se amplamente distribuído na Europa Mediterrânica e na Ásia Ocidental (De Bustos e Jouve, 2002).

1.1.5- Importância econômica

O centeio, *S. cereale* L., é uma cultura importante, especialmente em zonas da Europa do Norte e do Oriente com solos pobres e invernos rigorosos, com características fisiológicas muito vantajosas como, a eficiência de nutrientes e a tolerância ao stress hídrico, suportando assim a seca e, ainda, a capacidade para crescer em solos arenosos com baixa fertilidade e em solos ácidos (Zohary e Hopf, 2000; Bolibok *et al.*, 2005; Chikmawati *et al.*, 2005; Akhavan *et al.*, 2009). O centeio consegue obter um bom rendimento em áreas onde mais nenhuma cultura consegue crescer, ou seja, em áreas que não são adequadas para a cultura de outros cereais (Bushuk, 2001).

Os centeios têm outras características como, um elevado teor proteico e a resistência a doenças assim como, características bioquímicas e morfológicas que conferem ao centeio um valor acrescentado para introgressão no melhoramento do trigo (*Triticum* spp. L.), do tritcale (*xTriticosecale* Wittmack) e de outras culturas relacionadas (Ma *et al.*, 2004; Chikmawati *et al.*, 2005). A cruzabilidade e as características fisiológicas vantajosas do *S. cereale* tornaram-no, portanto, um recurso precioso para encontrar novos genes úteis e para desenvolver programas de melhoramento que utilizem o germoplasma do centeio de forma eficiente (Akhavan *et al.*, 2009).

O centeio é uma cultura altamente versátil. A sua farinha é usada no fabrico do pão, para produzir o pão de centeio escuro, ou então, juntamente com o trigo produzindo assim um pão de mistura (Bushuk, 2001). O pão de centeio escuro faz parte da dieta básica de milhões de pessoas na Europa de Leste e Central (Langer e Hill, 1991). O sabor característico do centeio é apreciado por muitos consumidores. Pequenas quantidades de centeio podem ainda ser usadas no fabrico de produtos especiais como pães lisos e biscoitos de centeio (Bushuk, 2001). A nível de produção, o centeio é inferior ao trigo além de possuir uma farinha de menor qualidade (Matos, 2006).

Os grãos de centeio são muito utilizados na alimentação do gado. Para além disto, os grãos de centeio são, também, utilizados na produção de bebidas alcoólicas. O whisky Canadiano e o Bourbon contêm quantidades substanciais de centeio (Langer e Hill, 1991; Bushuk, 2001).

Como planta verde pode ser usado para forragem e como adubação verde na rotação de culturas. A palha de centeio é fibrosa e muito resistente e, por isso, não é muito

utilizada na alimentação dos animais mas sim como cama (Bushuk, 2001). Uma pequena quantidade pode ainda ser usada na produção de papel (Langer e Hill, 1991; Bushuk, 2001).

O centeio é produzido e consumido como pão, principalmente, na Europa de Leste. Actualmente, os principais produtores são a Rússia, a Polónia, a Alemanha, a Bielorrússia, a Ucrânia, a China, a Espanha, a Turquia e o Canadá (FAO, 2009) (Figura 1.2).

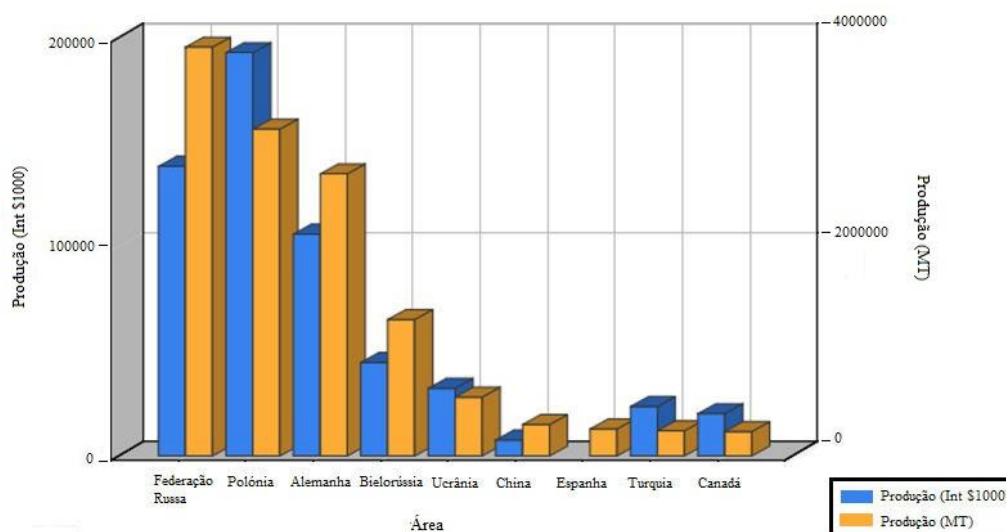


Figura 1.2: Produção de centeio em vários países, em 2007 (Adaptado de <http://faostat.fao.org/>)

A nível mundial, a produção de centeio sofreu um acentuado decréscimo nos últimos 20 anos (32511687 Mt em 1987, 25333011 Mt em 1997 e 14741248 Mt em 2007) (FAO, 2009). Entretanto, segundo a FAO observou-se um ligeiro aumento de produção em 2007 relativamente ao ano anterior (12611193 Mt em 2006).

A cultura do centeio tem uma grande importância no Norte de Portugal (Trás-os-Montes) quando comparada com as restantes zonas do país (Matos, 2006). Entre 2002 e 2006, houve um ligeiro acréscimo na produção de centeio na zona de Trás-os-Montes que passou para 68,5 % do centeio total produzido em Portugal (Figura 1.3). Na mesma altura, apenas se produziram 5 % de trigo a nível nacional em Trás-os-Montes, tendo-se produzido 85,5 % no Alentejo (INE, 2009). Isto pode ser explicado pelas condições edafo-climáticas da região de Trás-os-Montes, que tem solos pobres, declivosos e, na sua maioria, ácidos e com um clima muito rigoroso (Matos, 2006).

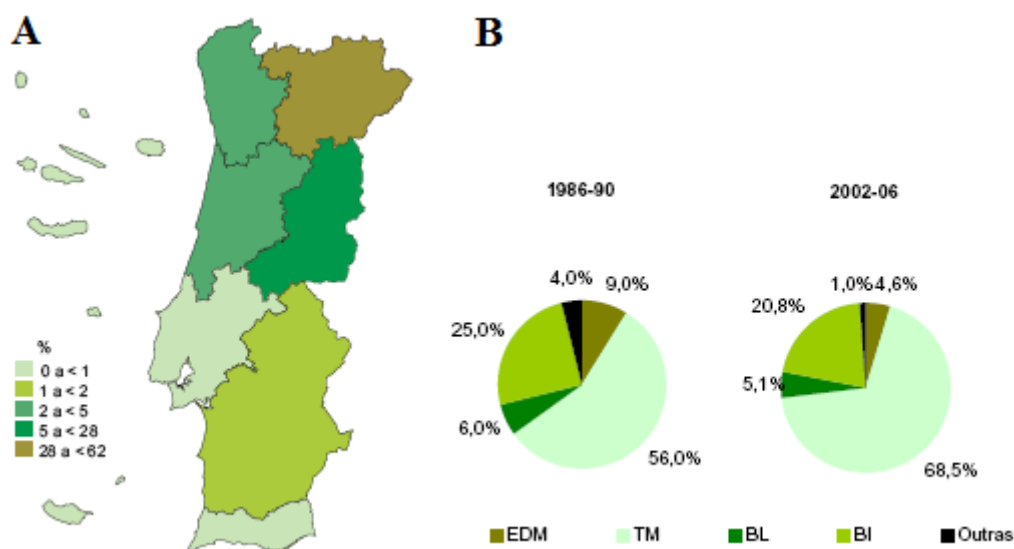


Figura 1.3: Área (A) e produção (B) de centeio em Portugal representado por região (EDM – Entre Douro e Minho; TM – Trás-os-Montes; BL – Beira Litoral; BI – Beira Interior) (Adaptado INE, 2007)

Em termos de produção nacional, assim como a nível mundial, também houve um declínio ao longo dos últimos 20 anos (121682 t em 1987, 40689 t em 1997 e 23808 em 2006). No entanto, observa-se um ligeiro aumento no último ano referenciado. Isto poderá ser sinal de que houve uma reintrodução do pão de centeio na dieta alimentar dos portugueses o que vem dinamizar novamente a cultura (INE, 2009) (Figura 1.4).

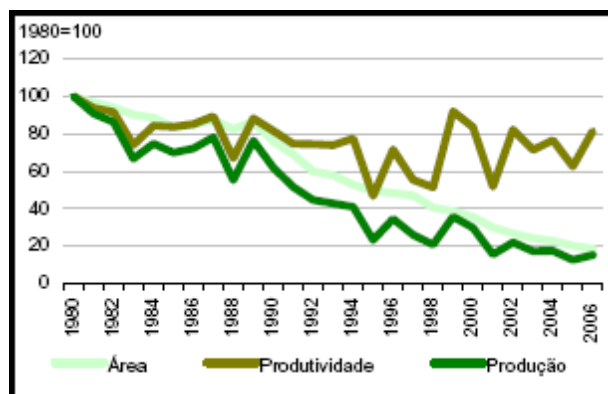


Figura 1.4: Área (ha), produção (t) e produtividade (kg/ha) de centeio em Portugal (Adaptado INE, 2007)

1.1.6- Benefícios a nível de saúde

O centeio é uma excelente matéria-prima para alimentos saudáveis e saborosos e contém um grande conteúdo em fibras (Zieliński *et al.*, 2007). As fibras solúveis, que ajudam a reduzir o risco de doenças cardiovasculares permitindo uma diminuição dos níveis de colesterol LDL no sangue, representam cerca de 17 % das fibras alimentares encontradas nos alimentos com grãos de centeio integrais (Rakowska, 1996). Para além deste benefício, a ingestão de alimentos com grãos integrais encontra-se também associada à diminuição de risco de outras doenças crónicas como a diabetes e a obesidade, para além de reduzir o risco de cancro (Bondia-Pons *et al.*, 2009).

Foi sugerido que, para além das fibras alimentares, vários fitoquímicos, vitaminas e minerais também contribuem benéficamente para a da saúde (Bondia-Pons *et al.*, 2009). Os grãos de centeio integrais têm na sua constituição muitas vitaminas e minerais importantes, como a vitamina B, a vitamina E, o cálcio, o magnésio, o fósforo, o potássio, o ferro, o zinco e o folato (Rakowska, 1996). Por isso mesmo, os produtos com grãos integrais possuem um grande potencial em termos de benefícios para a saúde humana, especialmente em termos preventivos (Bondia-Pons *et al.*, 2009).

Uma vez que os consumidores se preocupam cada vez mais com a saúde, existe uma relação directa entre a dieta e o bem-estar e os nutricionistas recomendam o aumento do consumo de produtos com grãos integrais e fibras alimentares. O centeio tem vindo a registar cada vez mais popularidade pelo que a sua procura tem tido um aumento (Zieliński *et al.*, 2007).

1.2- O Centeio e a tolerância ao alumínio

1.2.1- Acidez dos solos

A acidez dos solos tem vindo a tornar-se num grave problema ambiental (Karsai e Bedö, 1998).

Os solos ácidos encontram-se por todo o mundo (Samac e Tesfaye, 2003) e associada à toxicidade do alumínio representam a principal limitação para a produção

vegetal (Collins *et al.*, 2008). O alumínio (Al) é reconhecido como sendo o principal problema da produtividade nos solos ácidos (Miftahudin *et al.*, 2002).

Quando os solos se tornam ácidos, ou seja, quando o valor de pH é inferior a 5, como resultado de processos naturais ou de actividades humanas, a forma predominante do Al encontrada nos solos ácidos é o catião trivalente tóxico Al^{3+} (Matos *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). A acidez do solo acelera a libertação do Al dos minerais como a gibbsita e aumenta a concentração dos iões tóxicos Al^{3+} na solução do solo (Ryan *et al.*, 2009).

Os solos ácidos apresentam uma série de stresses para as plantas, incluindo deficiências de nutrientes e toxicidade de minerais (Kochian *et al.*, 2004). A baixa fertilidade dos solos ácidos deve-se a uma combinação de toxicidade do Al, do manganês e do ferro e a uma deficiência de fósforo, cálcio, magnésio e potássio (von Uexküll e Mutert, 1995).

Os solos ácidos limitam a produtividade da agricultura em várias regiões do mundo (von Uexküll e Mutert, 1995). Foi estimado que 30 a 40 % do solo arável mundial e mais de 70 % dos solos potencialmente aráveis são ácidos (Haug, 1983). Cerca de 67 % dos solos ácidos suportam florestas e bosques e aproximadamente 18 % estão cobertos por savanas, pradarias e estepes (von Uexküll e Mutert, 1995).

As regiões que se destacam por conter solos mais ácidos são a América do Sul, o Sudoeste Asiático, a África Central, uma parte central da América do Norte e a Europa Setentrional (Figura 1.5).

Em Portugal, cerca de 80 % dos solos são apontados como ácidos (Almeida, 1955) e é no Norte de Portugal onde os solos possuem um pH mais baixo (Figura 1.6).

O acréscimo da área de solos aráveis afectados pela acidez é uma grave ameaça na produção mundial de alimentos (von Uexküll e Mutert, 1995). Com a população mundial a crescer, torna-se evidente a necessidade de aumentar a produção agrícola de forma a acompanhar o crescimento populacional e um subsequente acréscimo de procura de alimentos. Para tal, para além do aumento de produção nos solos cultivados existentes também serão necessárias novas zonas para cultivar a fim de atender esta crescente solicitação por alimentos. A FAO indicou que as últimas grandes áreas de terra que podem ser convertidas para produção agrícola são os solos ácidos mundiais (Kim *et al.*, 2001).

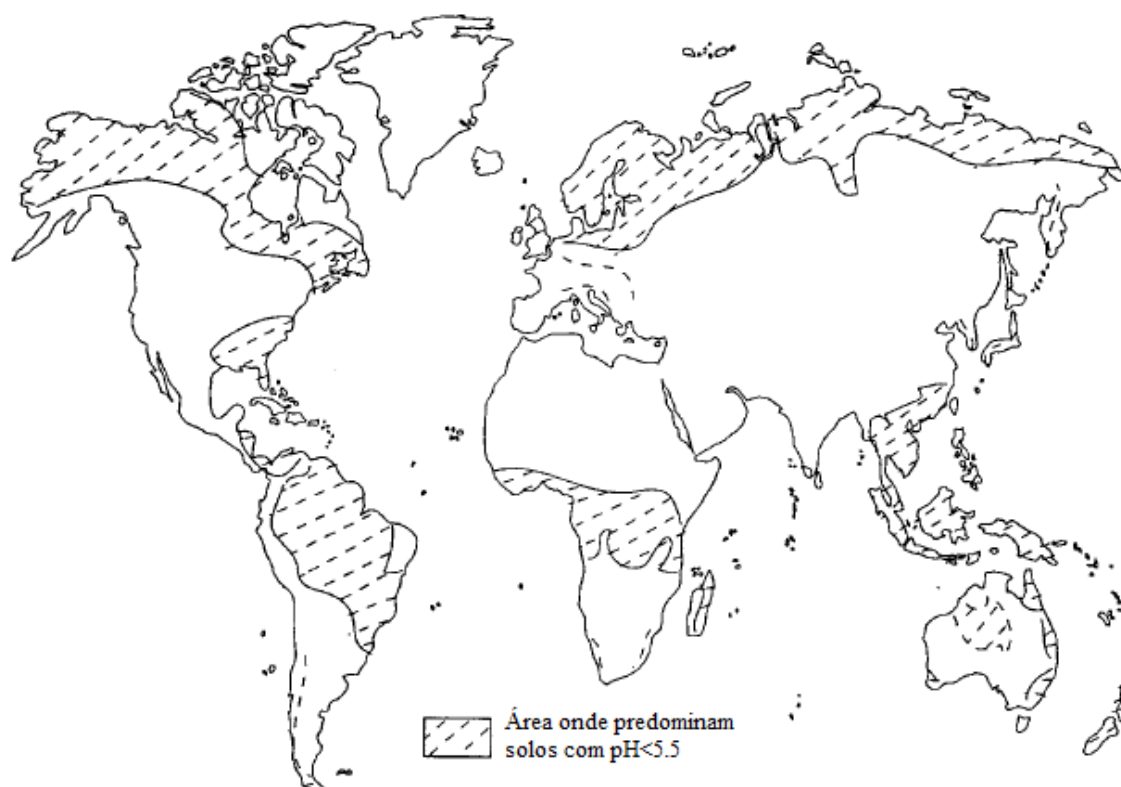


Figura 1.5: Distribuição dos solos ácidos a nível mundial (Adaptado de von Uexküll e Mutert, 1995)

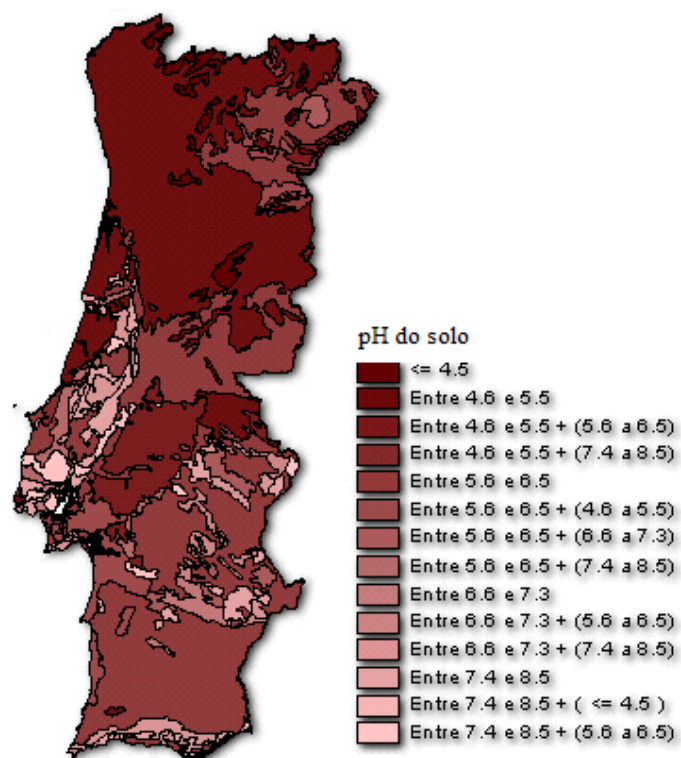


Figura 1.6: Distribuição do pH dos solos em Portugal continental (Adaptado de www.apambiente.pt)

Mais de 60 % dos solos ácidos do mundo estão nos países em desenvolvimento, onde a produção de alimentos é fundamental (Kochian *et al.*, 2005) e apenas 4,5 % dos solos ácidos são usados como solos aráveis (von Uexküll e Mutert, 1995).

A acidez dos solos pode desenvolver-se naturalmente quando os catiões básicos são lixiviados dos solos (Kennedy, 1986 citado por Delhaize e Ryan, 1995) devido a práticas humanas. O uso intensivo de fertilizantes de amónia na produção agrícola acelera o processo de acidez dos solos devido à nitrificação (Samac e Tesfaye, 2003; Zhou *et al.*, 2007) e a chuva ácida, que contém ácido sulfúrico e nítrico, também aumenta a taxa de acidez nos solos em vários locais do mundo (Samac e Tesfaye, 2003).

A aplicação directa de calcário (carbonato de cálcio) aos solos ácidos pode aumentar o pH do solo e converter o Al em formas menos tóxicas aliviando a toxicidade do Al nas plantas (Samac e Tesfaye, 2003; Zhou *et al.*, 2007). Para além desta estratégia, também se pode aplicar fósforo (P) a fim de os solos o absorverem e formar complexos com o Al (Samac e Tesfaye, 2003). Contudo, estas estratégias não são possíveis para determinados locais e os custos do transporte e do material são demasiado elevados (Samac e Tesfaye, 2003; Zhou *et al.*, 2007) para além de ser ineficaz no subsolo, pois apenas permite corrigir os primeiros 25 cm do solo (Pinto-Carnide *et al.*, 1990; Fontecha *et al.*, 2007). A correcção do solo a maiores profundidades implica grandes mobilizações de terreno e aplicações de maiores doses de calcário não se tornando tecnicamente praticável ou economicamente rentável (Pinto-Carnide *et al.*, 1990). Por esta razão, o desenvolvimento de novas variedades de plantas tolerantes ao Al parece ser a melhor solução para este problema (Fontecha *et al.*, 2007). Assim, um grande esforço tem sido feito para o desenvolvimento de génotipos de culturas que apresentam uma elevada tolerância ao Al. Os programas de melhoramento têm sido efectivos na produção de variedades tolerantes ao alumínio, especialmente com os cereais (Kochian *et al.*, 2002). O desenvolvimento de novos cultivares com uma tolerância ao Al crescente tanto em ambientes favoráveis como desfavoráveis é considerado como uma solução económica e fundamental para contribuir para o aumento da produção mundial de alimentos (Kim *et al.*, 2001).

1.2.2- O Alumínio

O alumínio (Al) é um metal leve que constitui mais de 7 % da crosta terrestre (Matos *et al.*, 2005), sendo um dos principais constituintes do solo (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1999). É o terceiro elemento mais abundante a seguir ao oxigénio e ao silício sendo o elemento metálico mais abundante da crosta terrestre (Ma e Furukawa, 2003).

As raízes das plantas estão quase sempre expostas ao Al nas mais variadas formas. O Al é encontrado nos solos principalmente na forma de óxidos e de silicatos de alumínio insolúveis que são inofensivos para as plantas (Gallego e Benito, 1997; Ma e Furukawa, 2003; Matos *et al.*, 2005). As formas fitotóxicas do Al são relativamente insolúveis em solos com valores de pH alcalino, neutro ou suavemente ácido (Kochian *et al.*, 2002). Contudo, nos solos ácidos com valores de pH igual ou inferior a 5,0 o Al é solubilizado na solução do solo formando o catião trivalente, Al^{3+} , que inibe o crescimento e a funcionalidade das raízes e, conseqüentemente, reduz o rendimento das culturas (Kochian *et al.*, 2002; Ma e Furukawa, 2003). O Al consegue inibir o alongamento radicular em poucos minutos ou horas, em concentrações micromolares. O efeito subsequente na absorção de nutrientes e água resultam num fraco crescimento e numa baixa produtividade (Ma e Furukawa, 2003).

A química do Al é bastante complexa (Panda e Matsumoto, 2007), dificultando o estudo dos mecanismos presentes nas plantas relacionados com o Al. O Al possui uma carga iónica elevada e um pequeno raio cristalino, o que lhe confere um nível de reactividade que é inigualável quando comparado com outros metais solúveis (Panda e Matsumoto, 2007). A química do Al em solução é complexa porque o Al hidrolisa numa forma dependente do pH para formar vários complexos com grupos hidroxilo (Ma e Furukawa, 2003).

O Al hidrolisa em solução de forma que o tipo de Al trivalente, o Al^{3+} , domina em condições ácidas ($\text{pH} < 5$), enquanto que os tipos $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ se formam quando o pH aumenta. A pH quase neutro, ocorre a fase sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$, ou gibbsita, enquanto que o $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, ou aluminato, domina em condições alcalinas. Muitos destes catiões de Al monoméricos ligam-se a vários ligantes orgânicos e inorgânicos como o PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , F^- , ácidos orgânicos, proteínas e lípidos (Delhaize e Ryan, 1995) e formam complexos solúveis tais como AlF^{2+} , AlF^{3+} e $\text{Al}(\text{SO})_4^+$ (Panda e Matsumoto, 2007). Quando as soluções de Al estão parcialmente neutralizadas com uma base forte, pode-se

formar um tipo de Al polinuclear muito tóxico, o Al_{13} $[AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{127+}]$ (Parker e Bertsch, 1992), no entanto, a sua ocorrência natural e contribuição para a toxicidade ao Al ainda são desconhecidas (Delhaize e Ryan, 1995).

Muitos catiões trivalentes são tóxicos para as plantas e, pelo facto da toxicidade do Al estar amplamente restrita às condições acídicas, geralmente assume-se que o Al^{3+} é o principal tipo fitotóxico (Delhaize e Ryan, 1995), sendo considerado o maior stress para as plantas apesar da sua toxicidade variar consideravelmente (Ma e Furukawa, 2003).

Cerca de 14,7 % dos solos mundiais foram descritos como tendo problemas de toxicidade do Al. Destaca-se a América Central e do Sul com 39 % de solos com toxicidade ao Al, onde se insere a Guiana Francesa (80 %) e o Brasil (63 %) que são dos países com maior percentagem de toxicidade ao Al. A Europa tem cerca de 8 % de solos com toxicidade ao Al destacando-se os seguintes países: a República Checa (46 %), a Macedónia (39 %), o Luxemburgo (31 %), a Eslovénia (30 %) e a Irlanda (29 %) (FAO, <http://www.fao.org/AG/agl/agll/terrestat/>).

O Al pode ter diversos efeitos e actuar de forma diferente em diferentes espécies (Delhaize e Ryan, 1995).

1.2.3- Toxicidade do alumínio

A primeira resposta ao stress do Al nas plantas ocorre nas raízes (Wang *et al.*, 2006) sendo a principal consequência a inibição do seu crescimento (Delhaize e Ryan, 1995; Ma e Furukawa, 2003) devido à destruição do ápice (Bennet e Breen, 1991). Portanto, o principal alvo da toxicidade ao Al é o ápice das raízes, afectando uma série de funções celulares diferentes (Samac e Tesfaye, 2003).

A exposição ao Al provoca a atrofia da raiz primária, inibe a formação de raízes laterais e afecta o desenvolvimento dos pêlos radiculares enquanto as pontas das raízes afectadas se tornam espessas, ou seja, o ápice das raízes fica tumefacto, devido à inibição do alongamento e da divisão celular (Samac e Tesfaye, 2003; Kochian *et al.*, 2005). O sistema radicular resultante encontra-se debilitado e o fraco desenvolvimento das raízes reduz a absorção de nutrientes e de água (Samac e Tesfaye, 2003; Sasaki *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007), tornando a planta mais susceptível ao stress hídrico (Samac e Tesfaye, 2003). Isto explica a razão da toxicidade do Al ser o principal factor limitante para a produção de culturas em solos ácidos (Sasaki *et al.*, 2004).

Os sintomas de determinadas plantas assemelham-se aos da deficiência de fósforo que se manifesta pelo nanismo geral, pequenas folhas verde-escuro, maturidade tardia, arroxamento de caules, folhas e nervuras e o amarelecimento e posterior morte das folhas (Foy, 1992 citado por Wang *et al.*, 2006).

Enquanto alguns sintomas e respostas de toxicidade ao Al se conseguem detectar dentro de segundos a minutos após a exposição ao Al, outros apenas são detectáveis a longo prazo (dentro de horas ou até dias) (Kochian *et al.*, 2005). No entanto, estes sintomas detectados a longo prazo podem não ser causados directamente pelo Al, mas ser uma consequência de alterações rápidas induzidas pelo Al noutros processos fisiológicos e bioquímicos, não explicando por isso os mecanismos primários da toxicidade (Matos, 2006).

O Al interfere com uma vasta série de processos físicos e celulares. A toxicidade do Al pode resultar de interacções complexas de Al com as vias apoplástica (parede celular), simplástica (citossol) e da membrana plasmática (Kochian *et al.*, 2005).

Pelo facto do Al ser tão reactivo, existem vários potenciais alvos associados com o crescimento das raízes para a ocorrência de lesão: a parede celular, a membrana plasmática (actividade da H^+ -ATPase, inibição da absorção de cationes e bloqueio de Al por canais de proteínas), as vias de transdução de sinais (ruptura da actividade H^+ e do Ca^{2+} citossólico e o stress oxidativo), o citoesqueleto da raiz e o núcleo/DNA (Kochian *et al.*, 2005).

O grau de toxicidade varia muito consoante a espécie vegetal, as condições de crescimento, as concentrações de Al e a duração da exposição (Kochian *et al.*, 2005). A toxicidade do Al é afectada por vários factores como o pH, a concentração de Al, a temperatura e a concentração de cationes e aniões na solução de cultura (Wang *et al.*, 2006).

A tolerância das plantas a determinada concentração de Al é variável de espécie para espécie (variação interespecífica) e dentro da mesma espécie (variação intraespecífica) (Pinto-Carnide, 1990).

Dentro das *Triticeae* cultivadas, os genótipos tolerantes do centeio são mais tolerantes ao Al do que os mais tolerantes dos triticales e dos trigos, enquanto as cevadas são os mais sensíveis ao Al (Collins *et al.*, 2008). Ou seja, o centeio é considerado o cereal mais tolerante à toxicidade do Al e a cevada o mais sensível. O triticale, híbrido anfidiplóide do trigo e do centeio, é considerado mais tolerante do que o progenitor trigo mas menos tolerante do que o centeio (Pinto-Carnide *et al.*, 1990).

O centeio representa um potencial recurso para a tolerância ao Al podendo ser usado no melhoramento do trigo e de outros cereais através do uso da engenharia genética (Collins *et al.*, 2008).

A percepção da toxicidade do Al e dos mecanismos de tolerância é um factor importante para o aperfeiçoamento de testes apropriados para poder seleccionar germoplasmas tolerantes e para o desenvolvimento de plantas com um melhor desempenho nos solos ácidos (Samac e Tesfaye, 2003).

1.2.4- Mecanismos de Tolerância ao Alumínio

Existe uma vasta variação genética na tolerância das plantas ao Al, tanto dentro como entre as espécies, sugerindo que as espécies ou cultivares tolerantes ao Al possuem vários mecanismos para a desintoxicação do Al (Ma e Furukawa, 2003). Matos *et al.* (2005) sugeriram a existência de um mecanismo de tolerância ao Al comum e conservado nas espécies da tribo *Triticeae*.

De uma forma geral, as estratégias que várias plantas adoptam para a tolerância ao Al dividem-se em duas categorias: mecanismos de resistência externos e mecanismos de tolerância internos (Kochian, 1995). A primeira consiste na exclusão do Al pelo ápice das raízes (mecanismo de exclusão) enquanto a segunda se baseia na tolerância ao Al que entra na planta.

Nos mecanismos de exclusão, o Al é excluído dos tecidos das plantas, principalmente da parte do simplasto do meristema da raiz (Kochian, 1995). Os possíveis mecanismos de exclusão ou de resistência externa são: a imobilização do Al na parede celular ou a baixa capacidade de troca de catiões da parede celular, a permeabilidade selectiva da membrana plasmática, a formação de uma barreira de pH induzida pela planta na rizosfera ou no apoplasma da raiz, a exsudação de ligantes quelantes, a exsudação de fosfato e o efluxo de Al (Taylor, 1991; Kochian, 1995), as alterações induzidas pelo Al^{3+} na membrana proteica e a actividade da ATPase na membrana microssomal (Matsumoto *et al.*, 1992).

Dos vários mecanismos de tolerância ao Al externos propostos, a exsudação dos ácidos orgânicos através das raízes foi descrito como sendo um dos mais importantes e é também o mais estudado (Matos *et al.*, 2005), assim como o mecanismo de tolerância ao Al mais comprovado (Kochian *et al.*, 2005). Para além da exsudação dos ácidos

orgânicos, Wang *et al.* (2006) destacaram ainda outros possíveis mecanismos de tolerância ao Al: a ligação do Al na parede celular, a produção de mucilagem na coifa e a exclusão do Al pelo plasmalema. No entanto, estes mecanismos não se encontram bem esclarecidos pelo facto de terem sido pouco explorados (Wang *et al.*, 2006).

Os mecanismos de resistência internos são aqueles que actuam dentro do simplasma e são mediados a nível celular tanto pela desintoxicação como pela imobilização de iões de Al que penetraram nas células das plantas (Taylor, 1995). Estes mecanismos concedem a capacidade para as plantas tolerarem os iões de Al no simplasma onde o Al que penetrou o plasmalema é isolado ou convertido numa forma inócua (Kochian, 1995). Os possíveis mecanismos para a resistência interna são: a quelação do Al no citosol, a compartimentação no vacúolo, a evolução das enzimas tolerantes ao Al e a elevada tolerância da actividade enzimática (Wang *et al.*, 2006). Recentemente, através de estudos em plantas que conseguem acumular Al, em níveis elevados, na parte aérea, foram apresentadas evidências para o mecanismo de tolerância interna com base na quelação e desintoxicação do Al no simplasto com aniões carboxilatos após a sua entrada na planta, (Kochian *et al.*, 2005).

A maioria das evidências aponta para um mecanismo de tolerância ao Al com base na exclusão do Al do ápice das raízes. Isto envolve a activação pelo Al de um transportador localizado na membrana plasmática das células das raízes que medeia a libertação dos aniões dos ácidos orgânicos para a rizosfera. Estes aniões orgânicos complexam e desintoxicam o Al^{3+} do solo (Kochian *et al.*, 2002).

Ultimamente, tem havido fortes evidências no papel importante que os ácidos orgânicos representam na desintoxicação do Al seja de forma externa ou interna (Ma, 2000). Várias espécies e cultivares tolerantes ao Al respondem ao stress do Al através da segregação de aniões de ácidos orgânicos específicos pelas raízes (Ma, 2000). Constatou-se, de facto, que quanto maior for a exposição ao Al das plantas pelas raízes maior é o registo de secreção de ácidos orgânicos (Li *et al.*, 2000).

As plantas diferem no tipo de ácidos orgânicos que segregam, nos padrões de segregação temporal, na sensibilidade à temperatura e nas dosagens de resposta ao Al. (Ma, 2000). Até agora, tanto o citrato, como o oxalato e/ou o malato têm sido identificados como os aniões de ácidos orgânicos segregados pelas raízes na resposta ao Al (Ma e Furukawa, 2003; Furukawa *et al.*, 2007). Os três aniões de ácidos orgânicos conseguem quelar o Al, contudo a capacidade de quelação difere (Ma e Furukawa, 2003), por exemplo, o citrato tem cerca de 6 a 8 vezes mais capacidade de quelar o Al

do que o malato (Furukawa *et al.*, 2007). Em algumas espécies vegetais, dois aniões de ácidos orgânicos são segregados como resposta à toxicidade do Al (Quadro 1.1). Estes aniões têm a capacidade de formar complexos estáveis com o Al, desintoxicando o Al externamente (Furukawa *et al.*, 2007) e prevenindo a ligação do Al aos componentes celulares (Ma e Furukawa, 2003), ou seja, fazem a quelação do Al^{3+} na rizosfera e previnem a sua entrada no ápice das raízes (Ma *et al.*, 2001).

Têm vindo a realizar-se, de uma forma intensiva, estudos fisiológicos para perceber a natureza da secreção dos aniões de ácidos orgânicos, tal como os ácidos málico e cítrico, induzida pelo Al (Kochian *et al.*, 2005) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1: Ácidos orgânicos exsudados em diferentes espécies vegetais

Espécie da planta	Ácido orgânico exsudado	Referência
<u>Monocotiledóneas</u>		
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Citrato	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000
Aveia (<i>Avena sativa</i>)	Malato e Citrato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
Centeio (<i>Secale cereale</i>)	Malato e Citrato	Li <i>et al.</i> , 2000
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Citrato	Zhao <i>et al.</i> , 2003
Milho (<i>Zea mays</i>)	Citrato	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000
	Citrato e Oxalato	Kidd <i>et al.</i> , 2001
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	Citrato	Magalhães <i>et al.</i> , 2007
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Malato	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000
	Citrato	Ryan <i>et al.</i> , 2009
Triticale (xTriticosecale)	Malato e Citrato	Ma <i>et al.</i> , 2000
<u>Dicotiledóneas</u>		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Malato	Hoekenga <i>et al.</i> , 2003
	Malato e Citrato	Liu <i>et al.</i> , 2009
Colza (<i>Brassica napus</i>)	Malato e Citrato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Citrato	Miyasaka e Hawes, 2001
Inhame (<i>Colocasia esculenta</i>)	Oxalato	Ma e Miyasaka, 1998
Rabanete (<i>Raphanus sativus</i>)	Malato e Citrato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
Soja (<i>Glycine max</i>)	Citrato	Yang <i>et al.</i> , 2001
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Citrato	Delhaize <i>et al.</i> 2001
Trigo-sarraceno (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Oxalato	Zheng <i>et al.</i> , 1998

Dois padrões de libertação de ácidos orgânicos foram identificados com base no tempo de segregação (Ma *et al.*, 2000). No padrão I, a segregação ocorre quase imediatamente após a exposição ao Al, sugerindo que o Al activa um canal de aniões pré-existent na membrana plasmática e que a indução de genes não é solicitada. Em contraste, no padrão II, a segregação de aniões de ácidos orgânicos é atrasada por várias horas após a exposição ao Al, sugerindo que a indução génica é requerida. Os genes devem estar relacionados com o metabolismo dos ácidos orgânicos (biossíntese e

decomposição), com os canais de aniões da membrana plasmática ou tonoplasto ou com o transporte dos ácidos orgânicos da mitocôndria (Ma *et al.*, 2000). Algumas proteínas indutíveis podem estar envolvidas no metabolismo dos ácidos orgânicos ou no transporte dos aniões dos ácidos orgânicos (Ma e Furukawa, 2003; Furukawa *et al.*, 2007). Diferentes mecanismos foram sugeridos como estando envolvidos nos dois tipos de segregação (Ma e Furukawa, 2003).

O padrão I foi descrito em espécies como o trigo, a cevada, o tabaco e o trigo-sarraceno, enquanto o padrão II foi descrito no centeio, no tritcale, no feijoeiro e igualmente na cevada (Li *et al.*, 2000; Ma e Furukawa, 2003). O facto de existirem padrões distintos de exsudação de ácidos orgânicos em diferentes espécies poderá estar ligado a um tipo diferente de expressão do mRNA (Fontecha *et al.*, 2007).

1.2.5- Controlo genético da tolerância ao alumínio

Vários investigadores reconheceram que a expressão dos genes de tolerância ao Al é induzida pela exposição ao metal tóxico o que levou a uma série de estudos com o objectivo de clonar estes genes (Kochian *et al.*, 2002).

Para detectar os genes implicados na resposta das plantas ao Al têm vindo a ser usadas várias estratégias moleculares (Fontecha *et al.*, 2007) tais como: estudos genéticos, mapeamento molecular, isolamento e caracterização de genes induzidos durante a toxicidade ao Al, desenvolvimento e estudo de plantas mutantes e uso de plantas transgénicas nos estudos da tolerância ao Al (Samac e Tesfaye, 2003).

Todas estas abordagens tiveram uma implicação prática no desenvolvimento de culturas mais adequadas ao cultivo nos solos ácidos e contribuíram para uma melhor compreensão do funcionamento dos mecanismos relacionados com a tolerância ao Al nas plantas (Samac e Tesfaye, 2003; Kochian *et al.*, 2005).

A variabilidade genética desta tolerância tem sido explorada para desenvolver variedades tolerantes e para estudar o número de genes envolvidos na tolerância a este metal (Samac e Tesfaye, 2003).

Tem vindo a verificar-se que este carácter pode ser controlado por um ou dois genes, como acontece no caso do trigo, da cevada e do sorgo, mas que também pode ser um carácter mais complexo, multigénico, como acontece com o milho e o arroz (Kochian *et al.*, 2002). Na tribo *Triticeae*, a tolerância ao Al possui uma herança

simples ou qualitativa onde um gene dominante envolve grande parte da tolerância ao Al observada. Por outro lado, o arroz e o milho possuem uma herança complexa e quantitativa onde vários genes são necessários para explicar as diferenças a nível de tolerância ao Al (Kochian *et al.*, 2005).

Entre as espécies cultivadas da tribo *Triticeae*, o género *Secale* é aquele que possui um dos grupos mais eficientes de genes para a tolerância ao alumínio (Gallego *et al.*, 1998a; Matos *et al.*, 2005). Foram descritos pelo menos 4 *loci* independentes e dominantes no centeio com a utilização de linhas de adição de trigo-centeio e através da análise de populações segregantes: o *Alt1*, o *Alt2*, o *Alt3* e o *Alt4* que se localizam nos braços cromossómicos 6RS, 3RS, 4RL e 7RS, respectivamente (Aniol e Gustafson, 1984; Gallego e Benito, 1997; Gallego *et al.*, 1998a; 1998b; Ma *et al.*, 2000; Miftahudin *et al.*, 2002; Aniol, 2004; Matos *et al.*, 2005).

Têm sido detectados vários genes activados pelo Al em genótipos tolerantes e sensíveis de várias espécies como o trigo, o arroz, o tabaco, a *Arabidopsis*, o feijão e o centeio e, também, genes que apenas se expressam nos genótipos tolerantes de espécies como a soja, o trigo e a *Arabidopsis* (Fontecha *et al.*, 2007; Matos *et al.*, 2007). Todos estes genes são úteis para serem clonados noutras espécies com o objectivo de encontrar mecanismos de tolerância ao Al nas plantas (Fontecha *et al.*, 2007).

Em 2004, Sasaki *et al.* identificaram e caracterizaram no trigo (*Triticum aestivum* L.) um gene que é responsável pela activação do malato, o *ALMT1* (*Al-activated malate transporter 1*). Este gene codifica um transportador que facilita o efluxo do anião orgânico malato.

Com a sequência deste gene (*TaALMT1*), Fontecha *et al.* (2007) desenharam *primers* e com a técnica da *PCR* amplificaram, clonaram e sequenciaram um gene de tolerância ao Al no centeio (*ScALMT1*). Subsequentemente, descobriram que se localizava no cromossoma 7RS onde se localiza o *locus Alt4* que codifica então o gene *ALMT1* e constataram que este gene se expressava inicialmente no ápice das raízes e que era induzido pela presença de Al. Para além disso, foi detectada uma maior expressão nos genótipos tolerantes em relação aos sensíveis e ainda nos genótipos de centeio relativamente aos de trigo o que sugere que o gene *ScALMT1* pode ser um recurso para uma maior tolerância ao Al nas espécies mais susceptíveis (Fontecha *et al.*, 2007). Ambos os genes (*TaALMT1* e *ScALMT1*) são ortólogos e possuem um grau de similaridade bastante elevado (98%) (Benito *et al.*, 2009).

Furukawa *et al.* (2007) identificaram e caracterizaram outro gene de tolerância ao Al na cevada (*Hordeum vulgare* L.) que é responsável pela secreção do citrato activado pelo Al, o *HvAACT1* (*Aluminum-Activated Citrate Transporter*). Este gene pertence à família *Multidrug And Toxic compound Extrusion* sendo, por isso, também conhecido por *HvMATE*. Este grupo de investigadores constatou que este gene se expressa constitutivamente nas raízes e, principalmente, nas cultivares tolerantes, não sendo portanto, a sua expressão induzida pela exposição ao Al. Magalhães *et al.* (2007) também identificaram o mesmo gene mas, desta vez, em sorgo (*SbMATE*). Collins *et al.* (2008) mapearam o gene ortólogo do centeio (*ScMATE*) no braço cromossómico 7RS do centeio, tal como o gene *ScALMT1*, a uma distância de 27,5 cM do locus *Alt4*. Recentemente, Yokosho *et al.* (2010) isolaram e caracterizaram dois genes homólogos do *MATE* no centeio, o *ScFRDL1* e o *ScFRDL2*.

Liu *et al.* (2009) estudaram o gene *ALMT1* e o gene *MATE* em *Arabidopsis* e sugeriram que ambos os mecanismos de exsudação evoluem independentemente para conferir a tolerância ao Al na *Arabidopsis*.

Uma vez que o centeio se torna útil como recurso de novos genes para o trigo (*Triticum* spp.) através da introgressão de trigo-centeio, o esclarecimento dos mecanismos e dos genes que controlam a tolerância ao Al no centeio irá providenciar um conhecimento fundamental que poderá ser usado para aumentar a tolerância ao Al noutros cereais (Miftahudin *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2005).

1.3- Marcadores moleculares

Considera-se como marcador genético qualquer *locus* que pode ser referente a um carácter morfológico, uma proteína ou um fragmento de DNA e cuja presença num conjunto de genótipos se manifesta como polimórfica, sendo portanto susceptível de ser utilizado, em combinação com outros marcadores, como característico de um determinado genótipo (O'Brien, 1990). Os marcadores genéticos são regiões do genoma herdadas de acordo com as leis de Mendel que diferenciam genótipos. Os marcadores facilitam a detecção de diferenças na informação genética contida nos indivíduos através da sua ligação a genes de interesse (Lefebvre e Chèvre, 1995).

Os marcadores genéticos podem agrupar-se em três grandes grupos: marcadores morfológicos, marcadores cromossómicos e marcadores moleculares. Por sua vez, os

marcadores moleculares podem dividir-se em marcadores bioquímicos como as isoenzimas e em marcadores de DNA que podem ser obtidos através da hibridação de DNA como os RFLPs ou com base em técnicas da *PCR* como os *RAPDs*, *AFLPs* e *SSRs* (Matos, 2006).

Os marcadores morfológicos geralmente correspondem a traços qualitativos que podem ser facilmente distinguíveis (Lefebvre e Chèvre, 1995). Possuem certas restrições pois estão limitados a poucas características, mostram um baixo grau de polimorfismo, a sua manifestação é variável porque estão sujeitos à acção do ambiente, podem depender da expressão de vários genes não ligados e são dependentes do estágio de desenvolvimento. Os marcadores morfológicos foram em grande parte suplantados pelos marcadores bioquímicos, particularmente pelas isoenzimas (Schulman, 2007).

Os marcadores bioquímicos consistem em proteínas que são produzidas através da expressão génica, sendo as isoenzimas proteínas que catalizam a mesma reacção enzimática e ainda o produto de vários alelos de um ou vários genes (Lefebvre e Chèvre, 1995). A utilização de métodos bioquímicos suprime a influência ambiental, contudo, engloba restrições pelo facto de terem um número limitado de enzimas polimórficas, ou seja, não conseguem detectar níveis de variação altos (Rao, 2004; Schulman, 2007).

As desvantagens dos marcadores morfológicos e dos marcadores bioquímicos levaram ao desenvolvimento de marcadores com base em polimorfismos de DNA, visto não serem influenciados por factores ambientais e serem independentes do estágio de desenvolvimento da planta (Ma *et al.*, 2004; Schulman, 2007). Um marcador molecular é uma sequência de nucleótidos que corresponde a uma localização física particular no genoma. Este tipo de marcadores origina padrões distintos de fragmentos de DNA que permitem a detecção e análise de variações (polimorfismos) ao nível das sequências do DNA.

Um bom marcador de DNA deve ter as seguintes características: natureza altamente polimórfica, herança co-dominante, ubiquidade no genoma, comportamento selectivamente neutro, facilidade e rapidez no desenvolvimento, económico, elevada reprodutibilidade e possibilidade de troca acessível de dados entre laboratórios. É extremamente difícil encontrar um marcador molecular que preencha todos estes requisitos, não havendo por isso um marcador ideal (Joshi *et al.*, 1999). Graças aos avanços nas técnicas da biologia molecular, um vasto número de marcadores de DNA

altamente informativos têm sido desenvolvidos para a identificação do polimorfismo genético (Bardakci, 2001).

Os progressos efectuados com recurso a marcadores moleculares permitem, actualmente, uma análise facilitada de um vasto número de *loci* distribuídos através do genoma. Os marcadores moleculares provaram ser ferramentas poderosas na avaliação da diversidade genética tanto dentro como entre populações de plantas como na elucidação de relações genéticas entre cultivares dentro de uma espécie (Loarce *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2004).

Uma forma de obter facilmente marcadores moleculares é através da técnica da *PCR* (Del Pozo *et al.*, 1995). A Reacção em Cadeia da Polimerase – *PCR* foi introduzida por Mullis *et al.* (1986) e consiste basicamente na amplificação enzimática, *in vitro*, de um fragmento de DNA, de uma forma exponencial, simulando o processo de replicação que ocorre *in vivo*.

Esta técnica reduz consideravelmente o tempo experimental requerido o que facilita a análise de um elevado número de indivíduos, evita a utilização de isótopos radioactivos, é extremamente simples de realizar, necessita de uma quantidade mínima de amostra de DNA inicial e tem uma grande probabilidade de sucesso (Del Pozo *et al.*, 1995; Bardakci, 2001; Bornet e Branchard, 2001).

O aparecimento da *PCR* originou o desenvolvimento de vários tipos de marcadores diferentes. Estes dividem-se, essencialmente, em duas grandes categorias: métodos que detectam alvos específicos, clonados e sequenciados no genoma e métodos que utilizam *primers* não específicos que amplificam vários locais ao acaso através do genoma (Schulman, 2007). Um dos primeiros marcadores com base na *PCR* pertence à segunda categoria, são os *RAPDs* (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Em 1990, Williams *et al.* descreveram este novo método de análise de polimorfismo de DNA com base na amplificação de segmentos de DNA utilizando um *primer* com sequências nucleotídicas arbitrárias e homólogos a locais alvo ao acaso no genoma. A tecnologia dos *RAPDs* utiliza então como *primers* sequências ao acaso de pequenos oligonucleótidos sintéticos, com 10 bases de comprimento, para amplificar quantidades mínimas (ng) de DNA genómico total sob baixas temperaturas de *annealing* através da *PCR*. Os marcadores *RAPDs* são herdados de forma mendeliana (Williams *et al.*, 1990).

A análise de *RAPDs* é uma das técnicas de marcadores utilizadas com mais frequência pelas diversas vantagens que apresenta: não necessita do conhecimento prévio do genoma alvo, é relativamente simples e rápida de realizar, não necessita de

sondas radioactivas, requiere apenas pequenas quantidades de DNA inicial, é eficaz e fácil de aplicar, é necessário menos trabalho laboratorial, o número de *loci* que pode ser examinado é praticamente ilimitado e possuem um baixo custo (Iqbal e Rayburn, 1994; Loarce *et al.*, 1996; Bardakci, 2001; Persson *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Schulman, 2007). Pelo facto de não ser necessário a clonagem, sequenciação ou qualquer outra forma de caracterização molecular do genoma das espécies em questão, este método é adequado para estudos de espécies que não são totalmente conhecidas a nível molecular (Persson *et al.*, 2001). A técnica de *RAPDs* consegue originar um elevado número de marcadores num curto período de tempo (Bardakci, 2001).

Contudo, os *RAPDs* têm limitações. Uma das suas principais desvantagens é a falta de reprodutibilidade, o que é consequência da sua sensibilidade a mudanças nas condições da *PCR* e, também, por causa do pequeno comprimento do único *primer* usado que obriga à utilização de baixas temperaturas de *annealing* nas reacções (Bardakci, 2001; Persson *et al.*, 2001; Schulman, 2007). Assim, é conveniente manter as mesmas condições laboratoriais e de reacção para os perfis de amplificação serem consistentes (Williams *et al.*, 1990; Iqbal e Rayburn, 1994).

Outra desvantagem relevante é o facto dos marcadores *RAPDs* serem dominantes, ou seja, não é possível distinguir se o segmento de DNA amplificado provém de um *locus* heterozigótico ou homozigótico (Williams *et al.*, 1990; Iqbal e Rayburn, 1994). Para contornar este problema deve-se aumentar o número de *loci* no estudo para ser mais viável (Iqbal e Rayburn, 1994).

Os *RAPDs* têm sido usados nos mais variados trabalhos efectuados em centeio: para quantificar a variabilidade genética de populações e estudar as relações filogenéticas entre diferentes cultivares (Iqbal e Rayburn, 1994; Del Pozo *et al.*, 1995; Loarce *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 2001; Persson *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004), para detectar e localizar genes de interesse (Gallego *et al.*, 1998a; Gallego *et al.*, 1998b), para construir mapas genéticos (González *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2005), entre outros.

Os *RAPDs* têm sido usados em várias culturas, para além do centeio, para identificar cultivares e revelar relações filogenéticas entre elas como, por exemplo, na cevada (Fernández *et al.*, 2002), no trigo (Cao *et al.*, 1999), no arroz (Yu e Nguyen, 1994), na cevada silvestre (Tanyolac, 2003), no amendoim (Raina *et al.*, 2000), no género *Citrus* (Biswas *et al.*, 2010), na *Vigna umbellata* (Muthusamy *et al.*, 2008) e na rastreabilidade de azeites portugueses (Santos, 2006).

A baixa reprodutibilidade dos marcadores *RAPDs* e as desvantagens de outros tipos de marcadores moleculares como o elevado custo dos *AFLPs* e o facto de ser necessário desenvolver *primers* específicos de determinadas espécies para os *SSRs*, levaram ao aparecimento dos marcadores *ISSRs* (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Reddy *et al.*, 2002).

Os *ISSRs* são uma técnica de marcadores moleculares que foi desenvolvida por Zietkiewicz *et al.* (1994) e que envolve a amplificação por *PCR* de regiões entre microsatélites inversamente orientados e relativamente próximos. Esta técnica utiliza microsatélites ancorados nas extremidades 5' ou 3' como *primers*, geralmente com 16 a 25 pb e baseados em repetições di-, tri-, tetra- e pentanucleótidos (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Os *ISSRs* são marcadores *multiloci* semi-arbitrários (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet e Branchard, 2001).

Tal como os *RAPDs*, os *ISSRs* não necessitam de informação acerca da sequência do genoma a analisar, requerem uma baixa quantidade de DNA, não é necessária a utilização de isótopos radioactivos, são eficientes, rápidos e fáceis de aplicar (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet e Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002). No entanto, ao contrário dos *RAPDs*, os *ISSRs* são bastante reprodutíveis pelo facto de possuírem *primers* de maior comprimento o que leva à utilização de maiores temperaturas de *annealing* (45°C – 60°C) (Bornet e Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002). Para além disto, os *ISSRs* são universais graças à natureza ubíqua dos microsatélites nos genomas eucariotas e são altamente polimórficos (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet e Branchard, 2001; Vaillancourt *et al.*, 2008). A principal limitação dos *ISSRs* é a sua dominância como acontece também com os *RAPDs* (Reddy *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, a técnica de *ISSR* tem vindo a ganhar cada vez mais popularidade e tem tido várias aplicações nas mais variadas espécies. No centeio, não se conhecem muitos trabalhos com este marcador, nomeadamente, na procura de marcadores a fim de detectar e localizar genes de interesse ou de outros traços agronómicos importantes (Camacho *et al.*, 2005), na identificação de cultivares através de relações filogenéticas (Matos *et al.*, 2001), na detecção de diversidade genética (Bolibok *et al.*, 2005) e, finalmente, na caracterização, identificação e localização cromossómica para efeitos de melhoramento genético (Vaillancourt *et al.*, 2008).

Os *ISSRs* também têm sido aplicados a outras espécies: no *fingerprinting* de DNA em trigo (Carvalho *et al.*, 2005) e em batata (Prevost e Wilkinson, 1999), na rastreabilidade de azeites portugueses (Santos, 2006), na identificação de genes

agronomicamente importantes em trigo (Ammiraju *et al.*, 2001) e na análise filogenética e de diversidade genética na cevada (Fernández *et al.*, 2002), no arroz (Virk *et al.* 2000), no milho (Kantety *et al.*, 1995), no sorgo (Yang *et al.*, 1996) e no trigo (Carvalho *et al.*, 2009).

Tanto os *ISSRs* como os *RAPDs* providenciam um método rápido para a produção de marcadores polimórficos (Matos *et al.*, 2001). Ambos os marcadores mostraram ser eficazes e bastante úteis no *fingerprinting* de DNA, na construção de mapas genéticos, no estabelecimento de relações filogenéticas inter e intraespecíficas e nos programas de melhoramento genético.

2- Objectivos

Este estudo teve como objectivos a caracterização da tolerância ao alumínio de espécies silvestres e cultivadas do género *Secale* e a avaliação da variabilidade genética de três exões do gene *MATE* implicado nesta característica. Pretendeu-se, também, determinar as relações filogenéticas dos genótipos em estudo com recurso aos marcadores moleculares *ISSRs* e *RAPDs*.

Para conseguir estes objectivos seguiram-se as seguintes etapas:

- Caracterização quanto à tolerância ao alumínio de cerca de 15 plantas de cada genótipo de centeio, utilizando o teste de tolerância ao alumínio descrito por Aniol (1984) e adaptada por Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1997) a uma concentração de 10 ppm de Al;
- Extracção de DNA das raízes dos centeios em estudo, utilizando o método em pequena escala DNeasyTM Plant Mini-Kit da Qiagen, de cerca de 15 plantas por genótipo;
- Análise da variabilidade genética e determinação das relações filogenéticas através da utilização de marcadores *RAPDs* seguindo o protocolo descrito por Williams *et al.* (1990), com algumas modificações;
- Análise da variabilidade genética e determinação das relações filogenéticas através da utilização de marcadores *ISSRs* utilizando o protocolo descrito por Zietkiewicz *et al.* (1994), com algumas modificações;
- Estudo preliminar da variabilidade genética do gene *MATE*.

3- Material e Métodos

3.1- Material vegetal

Foram estudadas três espécies do género *Secale*: *Secale cereale* L., *Secale montanum* Guss. e *Secale vavilovii* Grossh.. Dentro do *S. cereale* estudaram-se ainda três subespécies: *S. cereale* subsp. *ancestrale* Zhuk., *S. cereale* subsp. *cereale* (o único centeio cultivado) e *S. cereale* subsp. *segetale* Zhuk.. Dentro do *S. montanum* estudou-se a subespécie *S. montanum* subsp. *kuprijanovii* (Grossh.) K. Hammer. Dentro do *S. cereale* subsp. *cereale* estudaram-se duas variedades estrangeiras (Imperial e JNK) e duas populações regionais (Alvão e Montalegre).

As espécies silvestres foram gentilmente cedidas pelo Professor Edward Larter da Universidade de Manitoba (Winnipeg, Canadá). O centeio JNK foi gentilmente cedido pelo Professor Neil Jones da Universidade de Aberystwyth, Inglaterra. O centeio D. Zlote pelo Professor Andrzej Aniol do Instituto “Plant Breeding and Acclimatisation” de Varsóvia (Polónia) e multiplicada durante várias gerações, pela Professora Olinda Carnide na UTAD. O centeio Riodeva e Imperial foram gentilmente cedidos pelo Professor César Benito da Universidade Complutense de Madrid e multiplicados na UTAD. As populações regionais, Alvão e Montalegre, foram obtidas nos agricultores das respectivas regiões.

A linha pura Riodeva é considerada sensível ao alumínio (Gallego e Benito, 1997; Camacho *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2005; Fontecha *et al.*, 2007) enquanto a cultivar Dankowskie Zlote é referida como sendo relativamente tolerante (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1999; Kim *et al.*, 2001; Jozefaciuk e Szatanik-Kloc, 2003, 2004) e, por essa razão, ambas foram utilizadas como testemunhas. Avaliaram-se ainda, como testemunhas, duas linhas designadas LA1 e LA2 obtidas a partir da selecção durante seis gerações de autofecundação para a tolerância e sensibilidade, respectivamente, da população de Lamego.

O grão deste material vegetal em estudo encontrava-se armazenado no Banco de germoplasma do Departamento de Genética e Biotecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Para facilitar a designação dos centeios em estudo foram usados códigos conforme descrito no Quadro 3.1.

Quadro 3.1: Código dos centeios em estudo

Genótipos de centeiro	Designação
<u>Espécies/Subespécies</u>	
<i>S. ancestrale</i>	ANC
<i>S. kuprijanovii</i>	KUP
<i>S. montanum</i>	MTN
<i>S. segetale</i>	SEG
<i>S. vavilovii</i>	VAV
<u>Variedades</u>	
Imperial	IMP
JNK	JNK
Riodeva (testemunha)	RIO
Dankowskie Zlote (testemunha)	ZLO
<u>Populações/Linhas</u>	
Alvão	ALV
Lamego sensível (testemunha)	LA1
Lamego tolerante (testemunha)	LA2
Montalegre	MTL

3.2- Metodologia

3.2.1- Teste de tolerância ao alumínio

O material vegetal foi submetido a um teste de tolerância ao alumínio utilizando a metodologia de cultura em solução nutritiva descrita por Aniol (1984) e adaptada por Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1997) a uma concentração de 10 ppm de Al. O teste foi feito em simultâneo com todo o material vegetal em estudo de forma a uniformizar as condições do ensaio. Foi feita a caracterização da tolerância ao alumínio de cerca de 15 plantas de cada espécie/variedade/população.

Os grãos de centeiro em estudo foram devidamente desinfectados durante cerca de 10 min com uma solução desinfectante [3 água destilada: 1 lixívia comercial], tendo sido lavados com água destilada. De seguida, os grãos foram colocados a germinar em papel de filtro humedecido com água destilada a uma temperatura de $\pm 7^{\circ}\text{C}$ durante

algumas horas tendo sido depois transferidos para uma estufa a 25°C durante dois dias (Figura 3.1).

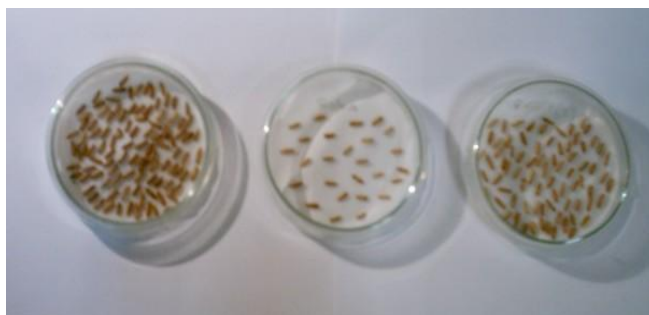


Figura 3.1: Grãos de centeio a germinar em placas de Petri

Após este período, os grãos germinados foram colocados em estruturas de rede de nylon que foram introduzidas num tabuleiro, previamente colocado em banho-maria à temperatura de 25°C, contendo uma solução nutritiva com pH ajustado a 4,0 [para cada litro de ddH₂O juntaram-se 2 mL de solução base: 22,20 g de CaCl₂, 32,86g de KNO₃, 25,41 g de MgCl₂.6H₂O, 0,66 g de (NH₄)₂SO₄ e 1,60 g de NH₄NO₃ para 1 L]. As estruturas permaneceram durante dois dias na solução nutritiva (Figura 3.2) tendo-se colocado o sistema de arejamento ao fim de 24 horas.

Passado este tempo, o material foi transferido para um novo tabuleiro com uma nova solução nutritiva contendo a solução de alumínio [1 ppm de Al = 1 mL da solução de Al (8,94 g de AlCl₃.6H₂O em 1 L de ddH₂O) / 1 L de dH₂O]. As condições de pH e de temperatura da solução mantiveram-se. As raízes das plântulas foram expostas ao tratamento de choque do alumínio durante dois dias.

Ao fim desta etapa, as raízes foram lavadas com água destilada para eliminar o excesso de alumínio. Posteriormente, seguiu-se a fase da coloração. Colocaram-se as estruturas num novo tabuleiro com uma solução corante (Eriochrome cyanine R) para possibilitar a observação dos recrescimentos das raízes das plântulas (Figura 3.3). Após 30 min de exposição na solução de coloração, as raízes foram lavadas com água destilada de forma a retirar o excesso do corante.

Por último, o material vegetal foi transferido para uma nova solução nutritiva com as mesmas condições mas sem alumínio, durante mais dois dias.



Figura 3.2: Plântulas nas estruturas colocadas em tabuleiros com a solução nutritiva



Figura 3.3: Coloração das raízes das plântulas

Concluído o teste de tolerância ao alumínio, as plântulas foram retiradas das estruturas e procedeu-se à observação, medição e registo dos crescimentos e recrescimentos em três raízes por plântula considerando-se para análise dos resultados a média por plântula.

Consideraram-se plântulas tolerantes quando se verificaram recrescimentos, ou seja, os segmentos das raízes que cresceram após o tratamento de choque do alumínio eram de cor branca (não corada) e contrastavam com a cor ligeiramente rosa das partes expostas ao alumínio. Neste caso, o meristema apical das raízes não foi afectado pelo contacto com o alumínio. Por outro lado, consideraram-se plântulas sensíveis quando não se observaram recrescimentos nos extremos das raízes mantendo-se intensivamente corados. Os recrescimentos radiculares reflectem o nível de tolerância das plântulas ao alumínio (Figura 3.4).

As plântulas foram transferidas para uma estufa em vasos com turfa.



Figura 3.4: Plântulas tolerante e sensível ao alumínio

3.2.2- Extração de DNA de folhas

Foram colhidas folhas jovens de cerca de quinze plantas de cada espécie/variedade/população anteriormente testadas para a tolerância ao alumínio. Após a colheita, as folhas foram imediatamente congeladas com azoto líquido e armazenadas a -80°C até posterior utilização. Para extrair o DNA das folhas seguiu-se o método de pequena escala da Qiagen – *DNeasy™ Plant Mini-Kit* (Figura 3.5).



Figura 3.5: Kit utilizado para extração de DNA

Para cada planta foram macerados cerca de 100 mg de tecido foliar em azoto líquido com a ajuda de um pilão e de um almofariz até ficar reduzido a um pó muito fino. Colocou-se o macerado num tubo de 2 mL. Adicionaram-se 400 μL de tampão de lise AP1 seguido de 4 μL de RNase A (100 mg/mL) para degradar o RNA e agitou-se vigorosamente no vórtex. Seguidamente, a mistura foi incubada num banho termostático a 65°C durante 15 min, misturando-se por inversão duas a três vezes. Após este passo, as células ficam lisadas.

Em seguida, adicionaram-se 130 μL de tampão de precipitação AP2, misturou-se e incubou-se em gelo durante 5 min, ficando as proteínas e os polissacáridos precipitados. Procedeu-se a uma centrifugação de 5 min na velocidade máxima.

Após isto, aplicou-se a fase líquida resultante à coluna QIAshredder (lilás) colocada num tubo e centrifugou-se mais uma vez na velocidade máxima durante 2 min.

Transferiu-se a fase líquida para um novo tubo onde se adicionou ao lisado 0,5 do volume obtido na fase anterior de tampão de precipitação AP3 e um volume de etanol

absoluto, frio e misturou-se com a pipeta. De seguida, adicionaram-se 650 μL desta mistura à coluna DNeasy colocada num tubo e centrifugou-se a 8.000 rpm durante 1 min. Descartou-se a fase líquida obtida e repetiu-se este último passo utilizando a amostra restante, eliminando no final o tubo. Neste momento, o DNA ficou retido na membrana da coluna.

Colocou-se a coluna num novo tubo e adicionaram-se 500 μL de tampão de lavagem AW. Centrifugou-se durante 1 min a 8.000 rpm e descartou-se a fase líquida. Repetiu-se este passo mas, desta vez, com uma centrifugação de 2 min na velocidade máxima para secar a membrana.

Para finalizar, transferiu-se a coluna para um tubo de 2 mL onde se colocaram, directamente na membrana, 100 μL de tampão de eluição AE previamente aquecido a 65°C. Incubou-se a coluna à temperatura ambiente durante 5 min e centrifugou-se durante 1 min a 8.000 rpm. Repetiu-se todo o passo da eluição reutilizando o tubo. Eliminaram-se as colunas e armazenaram-se os tubos com o DNA eluído a 4°C.

3.2.3- Análise da quantidade e da qualidade do DNA extraído

A quantidade e a qualidade de DNA obtido, no processo de extracção anteriormente descrito, foram determinadas através de leituras no espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) e de electroforese em gel de agarose.

a) Espectrofotometria

O Nanodrop® tem a particularidade de quantificar ácidos nucleicos de forma rápida e fácil e ainda de verificar a sua pureza, utilizando apenas 1 μL de amostra. Para tal, com o braço do aparelho levantado, pipetou-se a amostra de gDNA directamente na base, fechou-se o braço e fez-se a medição com a ajuda do respectivo *software* instalado num computador (Figura 3.6). Na transição das medições, a base do aparelho foi limpa para evitar contaminações. O branco foi efectuado com o tampão AE utilizado anteriormente na extracção do DNA.

Foram feitas duas medições independentes por amostra e, caso houvesse muita discrepância entre as duas, efectuava-se uma terceira medição. Para análise dos resultados calculou-se a média das duas medições mais próximas (em ng/ μL). O grau de

pureza do gDNA foi determinado através da relação A_{260}/A_{280} que deve estar entre os valores 1.8 e 2.0, caso contrário, o gDNA extraído estaria na presença de contaminantes.



Figura 3.6: Quantificação de DNA efectuada no Nanodrop®

b) Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose permitiu fazer uma estimativa da quantidade do gDNA, verificar a sua integridade e confirmar a ausência de RNA. O resultado esperado seria o aparecimento de uma única banda nítida de elevado peso molecular, sem arrastamento.

Para fazer um gel, pesou-se a quantidade pretendida de agarose (Bioron) e dissolveu-se em tampão TBE1x (National Diagnostics) [solução 10x: 0,89 M Tris Borate, pH 8,3 e 20 mM Na_2EDTA]. O gel foi inserido numa tina de electroforese horizontal imerso na mesma solução tampão usada no gel (Figura 3.7).

Foram efectuadas electroforeses em géis de agarose a 1 %, aplicando em cada poço 5 μL de amostra de gDNA misturada com 2 μL de tampão de deposição [11,5 mL glicerol, 0,005 g bromofenol azul e 8,5 mL TBE 10x] que tem

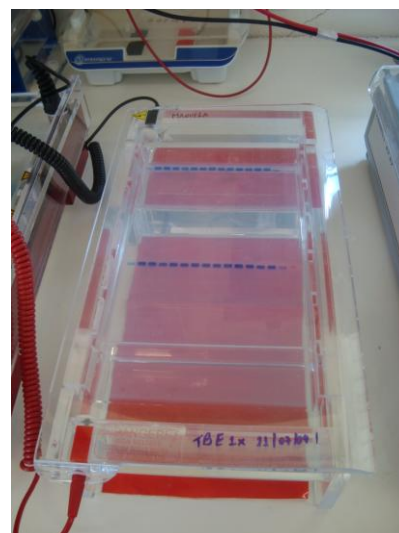


Figura 3.7: Electroforese em gel de agarose

como função mostrar a frente de migração e tornar o DNA mais denso. Aplicou-se uma corrente eléctrica de 90 V durante cerca de 1,30h e corou-se numa solução diluída de brometo de etídio (Sigma) [70 μL de EtBr em 1L de ddH_2O] que se intercala nas

cadeias de DNA e emite fluorescência quando exposto a radiações UV permitindo ver as bandas. Por último, captou-se a imagem do gel usando uma câmara escura ligada a um computador (Pentium II) com o *software* 'Biocapture' sob raios UV a 302 nm (Figura 3.8). As imagens foram guardadas, imprimidas e, posteriormente, analisadas.



Figura 3.8: Sistema de captação de imagem

Após a quantificação, as amostras de gDNA foram diluídas com água destilada ultra pura a uma concentração de 30 ng/μL de forma a ficarem todas uniformizadas para os estudos posteriores.

Foram feitos *bulks* com 30 μL de DNA de cada genótipo de centeio. Os *bulk* genéticos consistem na formação de uma solução de trabalho de gDNA, por cada espécie/subespécie/variedade/população, que contém uma mistura da mesma quantidade de gDNA de todas as plantas da amostragem de cada centeio.

3.2.4- Marcadores Moleculares

Para caracterização da variabilidade genética e determinação das relações filogenéticas dos centeios em estudo foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares, *RAPDs* e *ISSRs*.

Foram realizadas reacções de *RAPD* semelhantes às descritas por William *et al.* (1990) com modificações mínimas. Vinte e seis *primers* “10-mer” provenientes dos kits OPA, OPB e OPC (Operon Technologies) foram testados (Quadro 3.2).

Marcadores *RAPD***Quadro 3.2:** Sequências dos 26 *primers* testados na análise de *RAPD*

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'
<i>OPA01</i>	CAGGCCCTTC	<i>OPC05</i>	CATGACCGCC
<i>OPA04</i>	AATCGGGCTG	<i>OPC06</i>	GAACGGACTC
<i>OPA05</i>	AGGGGTCTTG	<i>OPC07</i>	GTCCCGACGA
<i>OPA06</i>	GGTCCCTGAC	<i>OPC08</i>	TGGACCGGTG
<i>OPA17</i>	GACCGCTTGT	<i>OPC09</i>	CTCACCGTCC
<i>OPB01</i>	CTTTCGCTCC	<i>OPC11</i>	AAAGCTGCGG
<i>OPB05</i>	TGCGCCCTTC	<i>OPC12</i>	TGTCATCCCC
<i>OPB06</i>	TGCTCTGCCC	<i>OPC13</i>	AAGCCTCGTC
<i>OPB07</i>	GGTGACGCAG	<i>OPC15</i>	GACGGATCAG
<i>OPB10</i>	CTGCTGGGAC	<i>OPC16</i>	CACACTCCAG
<i>OPC01</i>	TTCGAGCCAG	<i>OPC18</i>	TGAGTGGGTG
<i>OPC02</i>	GTGAGGCGTC	<i>OPC19</i>	CTTGCCAGCC
<i>OPC04</i>	CCGCATCTAC	<i>OPC20</i>	ACTTCGCCAC

Cada reacção de amplificação constou de 2,0 µL de gDNA (30 ng/µL), 2,5 µL de Tampão PCR 10x com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM) (Fermentas), 1,0 µL de *dNTPs* (10mM), 2,5 µL de *primer* (0,5 U), 0,4 µL de enzima *Taq Polymerase* (5 U/µL) (Fermentas) e 14,1 µL de ddH₂O para perfazer um volume final de 25 µL.

As amplificações de DNA efectuaram-se num termociclador T-Professional (Biometra) com o seguinte programa: um passo inicial de 5 min a 94°C, seguido de 45 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C e um passo final de 6 min a 72°C. Os tubos das reacções foram armazenados a 4°C a curto prazo e a -20°C a longo prazo (Figura 3.9).



Figura 3.9: Termociclador utilizado nas reacções de *RAPDs* e *ISSRs*

Os produtos das reacções foram separados através de electroforeses em géis de agarose a 1,8 % com corrente aplicada a 100 V durante cerca de 4h. Colocaram-se nos poços os produtos das *PCRs* na totalidade (25 µL) misturadas com 3 µL de tampão de deposição. Para verificar o tamanho dos fragmentos de DNA, colocaram-se 5 µL de um marcador de peso molecular padrão de DNA (*GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder* - Fermentas) [10 µL mistura de fragmentos, 10 µL solução de deposição 6x e 40 µL ddH₂O] no primeiro e no último poço (Figura 3.10). A verificação dos resultados das electroforeses foi efectuada conforme descrito anteriormente. As reacções de *RAPDs* foram repetidas pelo menos duas vezes e analisaram-se apenas as bandas reprodutíveis. Determinou-se o tamanho dos fragmentos de DNA, comparando a sua mobilidade com os fragmentos do marcador de peso molecular de DNA.

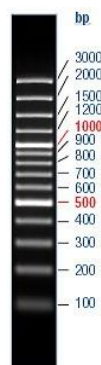


Figura 3.10: Marcador de peso molecular padrão de DNA. Este marcador ordena 14 fragmentos (em pb): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 (Adaptado de: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm>)

Marcadores *ISSR*

Foram testados dezoito *primers* baseados em repetições di-, e pentanucleótidas obtidos através de “UBC primer set 100/9” (University of British Columbia) (Quadro 3.3). Para as reacções de amplificação, adaptou-se o protocolo descrito por Zietkiewicz *et al.* (1994).

Cada reacção de amplificação constou de 1 µL de gDNA (30ng/ µL), 1 µL do *primer* correspondente (5 µM), 10 µL de Taq-PCR master mix (Qiagen) e 8 µL de água destilada ultra pura (Qiagen) para um volume final de 20 µL.

As amplificações de DNA realizaram-se num termociclador T-Professional (Biometra) seguindo o programa: um passo de desnaturação inicial de 5 min a 94°C

seguido por 45 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 52°C e 2 min a 72°C e um passo final de extensão de 10 min a 72°C.

Quadro 3.3: Sequências dos 18 *primers* testados na análise de *ISSR*

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'
UBC807	(AG) ₈ T	UBC836	(AG) ₈ YA
UBC808	(AG) ₈ C	UBC842	(GA) ₈ YG
UBC810	(GA) ₈ T	UBC844	(CT) ₈ RC
UBC811	(GA) ₈ C	UBC845	(CT) ₈ RG
UBC812	(GA) ₈ A	UBC846	(CA) ₈ RT
UBC815	(CT) ₈ G	UBC881	(GGGTG) ₃
UBC824	(TC) ₈ G	UBC887	DVD(TC) ₇
UBC827	(AC) ₈ G	UBC889	DBD(AC) ₇
UBC835	(AG) ₈ YC	UBC891	HVH(TG) ₇

Nota: B= (C, G, T); D= (A, G, T); R= (A, G); V= (A, C, G); Y= (C, T).

Os produtos das reacções dos *ISSRs* foram separados através de electroforeses em géis de agarose com as mesmas condições das reacções de *RAPDs*. A análise dos resultados também foi efectuada da mesma forma.

3.2.5- Sequenciação do gene *AACT1*

Para a caracterização da variabilidade genética do gene *AACT1* ou *MATE1* implicado na tolerância ao alumínio, seleccionou-se a planta mais sensível e a planta mais tolerante de cada espécie/variedade/população em estudo.

PCR-AACT1

Foram efectuadas três *PCRs* com um par de *primers* específicos em cada, desenhados por Silva-Navas *et al.* (2010), que flanqueiam determinados exões do gene *AACT1*, o exão 1, o exão 4 e o exão 8 (Quadro 3.4). Para levar a cabo as reacções de amplificação seguiu-se a metodologia descrita por Silva-Navas *et al.* (2010).

Para um volume final de 25 µL, cada reacção envolvia 2,5 µL de gDNA (30ng/µL), 2,5 µL de *primer Forward* (5 µM), 2,5 µL de *primer Reverse* (5 µM), 12,5 µL de Taq-PCR master mix (Qiagen) e 5 µL de água destilada ultra pura (Qiagen).

As amplificações de DNA foram realizadas num termociclador G-STORM™ GS1 (Gene Technologies) com um passo preliminar de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C e 2 min a 72°C e um último passo de 10 min a 72°C. Os produtos das reacções foram armazenados a 4°C (Figura 3.11).



Figura 3.11: Termociclador usado no *PCR-MATE1*

Quadro 3.4: Sequências de *primers* usados nas *PCR-AACT1* e tamanho esperado das bandas

<i>Primer</i>	<i>Sequência 5' – 3'</i>	pb	Exão
<i>AACT1-1F</i>	CGAGCGAACCATCGGCTGATCGAC	≈332	1
<i>AACT1-1R</i>	AGACGTGACGAAGACGAGCACTCGTAA	≈332	1
<i>AACT1-2F</i>	TTTCTATTGCCATATTTAACCAAG	≈1100	4
<i>AACT1-2R</i>	GAGCCGACATATCAAGATCATA	≈1100	4
<i>AACT1-3F</i>	CTTGATATGTCTGGCTCGTC	≈900	8
<i>AACT1-3R</i>	GGTGTAAGTCTTGCTCCGAAGTT	≈900	8

Verificação da amplificação

Cada reacção foi feita a duplicar com o intuito de verificar os resultados antes de fazer o corte e a purificação das bandas. Portanto, após cada reacção fez-se uma electroforese em gel de agarose para verificar a ocorrência das bandas esperadas.

Os géis de agarose foram feitos a 1,75 % em 100 mL de TBE 0,5X com brometo de etídio incorporado. No primeiro poço, colocaram-se 6 µL de marcador de peso molecular padrão (*GeneRuler™ DNA ladder Mix 100 bp* - Fermentas) e nos restantes colocaram-se 5 µL de produto de reacção misturados com 1 µL de tampão de deposição. A corrida de electroforese ocorreu a 90 V durante aproximadamente 3 h.

Corte de bandas

Para corte das bandas, fizeram-se géis de agarose a 2 % em 150 mL de TBE 0,5X com brometo de etídio incorporado. Colocou-se, igualmente, o marcador de peso molecular padrão no primeiro poço e nos restantes os 45 µL de produto de reacção que sobrou junto com 6 µL de tampão de deposição. As electroforeses foram efectuadas a 90 V durante cerca de 3 h.

Procedeu-se ao corte das bandas com o tamanho pretendido com a ajuda de um bisturi, um transiluminador e uma máscara. Por fim, as bandas foram colocadas em tubos de *ependorf* de 1,5 mL devidamente assinalados e armazenadas a -20°C até à posterior purificação.

Purificação de bandas

Para a purificação das bandas, seguiu-se o método do *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit* (Favorgen Biotech Corp) (Figura 3.12).



Figura 3.12: Kit de purificação utilizado.

Para fazer a dissociação do gel, adicionaram-se 500 µL de tampão FADF aos tubos com as bandas e passou-se pelo vórtex. Incubou-se a 55°C durante 10 min, invertendo-se os tubos de 2 em 2 min, até o pedaço de gel se dissolver completamente. Deixou-se arrefecer os tubos à temperatura ambiente durante 1 min.

Para ligar o DNA, colocaram-se colunas em tubos de 2 mL onde se aplicaram 800 µL de amostra. Centrifugou-se a 13.000 rpm durante 1 min e descartou-se o sobrenadante reutilizando o tubo com a coluna.

Para lavar o DNA, adicionaram-se 700 µL de tampão de lavagem na coluna e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 1 min. Mais uma vez descartou-se o sobrenadante

e colocou-se a coluna de novo no tubo. Centrifugou-se na velocidade máxima durante 3 min para secar a membrana completamente.

Por fim, para eluir o DNA, transferiu-se a coluna para um novo tubo e adicionaram-se 17 µL de água Mili Q directamente na membrana da matriz. Deixou-se à temperatura ambiente durante 5 min para que a água seja completamente absorvida pela matriz. Por fim, centrifugou-se durante 2 min na velocidade máxima. Eliminaram-se as colunas e armazenaram-se os tubos com o DNA purificado eluído a -20°C até enviar para sequenciar.

Quantificação do DNA purificado

Após a purificação das bandas, procedeu-se à quantificação do DNA purificado resultante com a ajuda de um espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 para verificar se havia DNA suficiente para enviar para sequenciar. Caso as amostras não correspondessem às expectativas, as *PCRs* eram repetidas.

Preparação das amostras para sequenciar

Num tubo de *epENDORF* de 1,5 mL colocaram-se 15 µL de amostra purificada juntamente com 15 µL de água Mili Q passando suavemente pelo vórtex. Num novo tubo de 1,5 mL, colocaram-se 15 µL desta mistura com 1,5 µL de *primer Forward* e num outro tubo, colocaram-se os restantes 15 µL da mistura com 1,5 µL de *primer Reverse*. Os tubos foram devidamente etiquetados e enviados para sequenciar na Secugen S.L. (*ABI PRISM 3700*, Applied Biosystems) em Madrid, Espanha.

3.3- Análise de resultados

Os fragmentos de DNA obtidos nas reacções de *RAPDs* e *ISSRs* com a mesma distância de migração foram considerados como um *locus*. Analisou-se a presença (1) ou ausência (0) de bandas reprodutíveis. Elaboraram-se duas matrizes, uma para os dados de todos os *primers* de *RAPDs* e outra para os dados de todos os *primers* de *ISSRs*, estas foram primeiro analisadas de forma independente e, posteriormente, unidas. As matrizes foram utilizadas para a análise de *clusters*. Os dendrogramas foram obtidos

empregando o coeficiente de similaridade SM – *Simple Matching* onde $SM = (a + d)/(a + b + c + d)$ sendo a o número de bandas presentes em ambos os indivíduos, b o número de bandas presentes em i mas ausentes em j , c o número de bandas presentes em j mas ausentes em i e d o número de bandas ausentes em ambos; i e j são o par de indivíduos comparado. O coeficiente de similaridade e o método de *clustering* foram efectivados utilizando o SIMQUAL (*Similarity of Qualitative data*) e o SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical Nested*) do programa NTSYS-pc v.2.02 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for Personal Computer*; Rohlf 1998) sendo aplicado o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

As sequências de DNA obtidas foram inicialmente analisadas utilizando o programa Chromas Lite v. 2.01(Technelysium Pty, Ltd.), onde se verificaram e corrigiram as indeterminações. As sequências foram, posteriormente, analisadas com o programa MEGA v.4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) onde se fizeram os respectivos alinhamentos e se analisaram os *SNPs* e os *INDELs* de cada centeio à procura de diferenças entre o material vegetal em estudo.

4- Análise de Resultados

4.1- Tolerância ao alumínio

Foram estudados 13 genótipos (espécies/subespécies/variedades/populações) de centeio à concentração de 10 ppm de alumínio usando-se como testemunhas tolerantes a variedade Dankowskie Zlote (ZLO) e a linha LA2, obtida por selecção de plantas tolerantes da população de Lamego. Como testemunhas sensíveis usaram-se a linha pura Riodeva (RIO) e a linha LA1, obtida por selecção de plantas sensíveis da população de Lamego. Após a medição de três raízes por planta, procedeu-se à análise da média dos comprimentos e dos recrescimentos radiculares (Figuras 4.1 e 4.2).

Do total de plantas testadas, separaram-se as plantas sem recrescimentos das plantas com recrescimentos. Dentro destas, consideraram-se as plantas com pequenos (0 – 1,5 mm), médios (1,5 – 3,5 mm) e grandes recrescimentos (> 3,5 mm) (Quadro 4.1).

Pela análise geral dos comprimentos das raízes, o *S. vavilovii* destacou-se, relativamente ao comprimento radicular dos restantes centeios conseguindo alcançar uma média de 77,4 mm enquanto o *S. montanum* obteve o valor mais baixo com 24,36 mm. Com a excepção do *S. montanum*, as espécies silvestres alcançaram, de uma forma geral, os valores mais elevados de comprimentos radiculares (Figura 4.1).

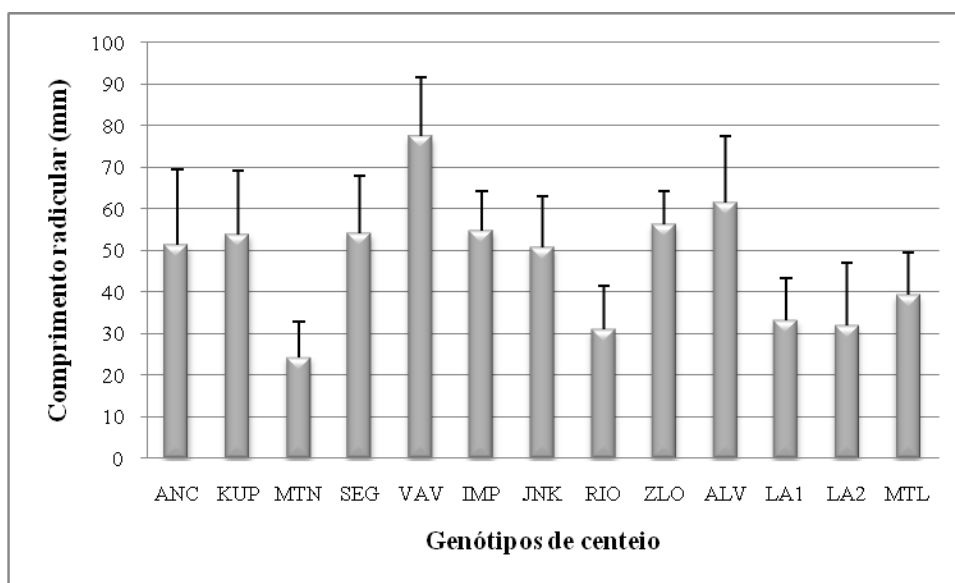


Figura 4.1: Média dos comprimentos radiculares dos genótipos de centeio

Dentro dos centeios cultivados, o centeiro Alvão obteve o valor mais elevado com 61,53 mm e a população de Montalegre o valor mais baixo com 39,33 mm. O centeiro Imperial e JNK registaram valores intermédios relativamente a estas duas populações.

Considerando as testemunhas, o centeiro Dankowskie Zlote registou o valor mais elevado de comprimento (56,33 mm) e o centeiro Riodeva o valor mais baixo (30,89 mm). As duas linhas do centeiro de Lamego obtiveram comprimentos idênticos (LA1 - 33,31 e LA2 - 31,91 mm) (Figura 4.1).

Relativamente aos recrescimentos radiculares, como era de esperar, a testemunha Riodeva apresentou recrescimentos nulos em todas as plantas, confirmando assim a sua grande sensibilidade. A linha LA1 obteve 0,79 mm confirmando também a sua baixa tolerância. Por outro lado, a testemunha Dankowskie Zlote, usada como testemunha tolerante obteve apenas 1,31 mm de média de recrescimentos enquanto a linha LA2 registou 3,73 mm evidenciando um comportamento mais tolerante. Na linha LA1 53,8 % das plantas tiveram recrescimentos nulos e na linha LA2, 45,5 % das plantas atingiram recrescimentos médios acima dos 3,5 mm (Figura 4.2).

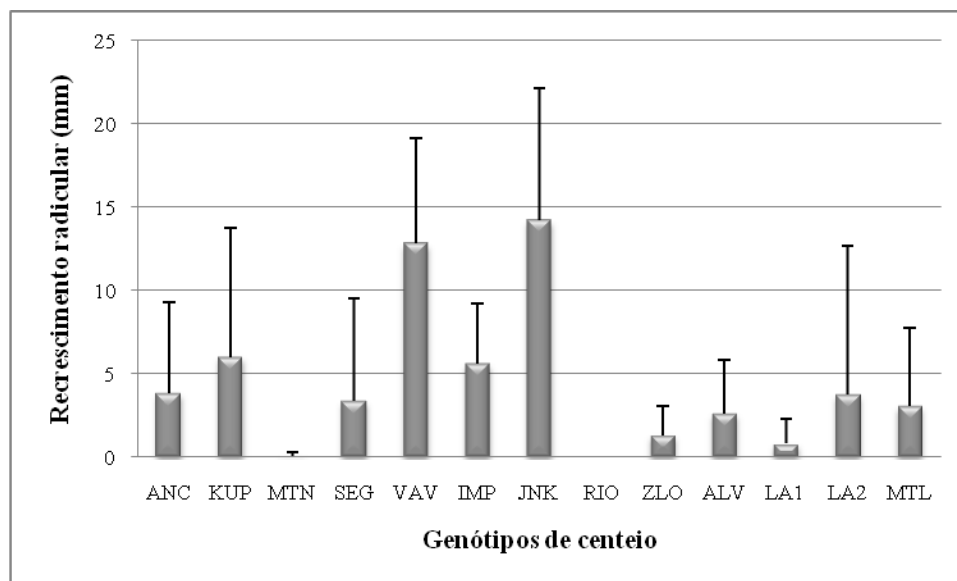


Figura 4.2: Média dos recrescimentos radiculares dos géótipos de centeeiro

Dentro dos centeios cultivados, os valores variaram entre 2,61 e 14,21 mm, nos centeios Alvão e JNK, respectivamente. Este último centeiro, além de apresentar os maiores valores médios de recrescimentos, não apresentou nenhuma planta com

recrescimentos nulos, e 80% das plantas atingiram valores elevados, na classe de recrescimentos > 3,5 mm (Figura 4.2).

O *S. vavilovii* mostrou ser a espécie selvagem mais tolerante ao Al conseguindo uma média de 12,82 mm de recrescimentos radiculares e 86,7 % das plantas com recrescimentos superiores a 3,5 mm. Contrariamente, o *S. montanum* revelou-se bastante sensível dado que registou, em média, apenas 0,08 mm de recrescimentos radiculares. Verificou-se que 75 % das plantas não obtiveram qualquer recrescimento e 25 % obtiveram recrescimentos com valores entre 0,33 e 0,50 mm, na classe mais baixa (Quadro 4.1).

É de realçar a grande variabilidade verificada no material estudado conseguindo-se obter plantas em todas as classes de recrescimentos, na maioria das espécies estudadas (Quadro 4.1), constatando-se assim uma variabilidade intra e interespecífica.

Quadro 4.1: Número e percentagem de plantas testadas com e sem recrescimentos

Centeios	Nº total de plantas	Nº de plantas sem recrescimentos	Nº de plantas com recrescimentos		
			0 - 1,5 mm	1,5 - 3,5 mm	> 3,5 mm
<u>Espécies/Subespécies</u>					
ANC	15	1 (6,7 %)	7 (46,7 %)	2 (13,3 %)	5 (33,3 %)
KUP	15	4 (26,7 %)	4 (26,7 %)	1 (6,7 %)	6 (40,0 %)
MTN	12	9 (75,0 %)	3 (25,0 %)	0	0
SEG	14	6 (42,9 %)	4 (28,6 %)	1 (7,1 %)	3 (21,4 %)
VAV	15	1 (6,7 %)	1 (6,7 %)	0	13 (86,7 %)
<u>Variedades</u>					
IMP	7	0	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)	5 (71,4 %)
JNK	10	0	1 (10,0 %)	1 (10,0 %)	8 (80,0 %)
RIO	15	15 (100 %)	0	0	0
ZLO	15	3 (20,0 %)	8 (53,3 %)	2 (13,3 %)	2 (13,3 %)
<u>Populações/Linhas</u>					
ALV	12	3 (25,0 %)	4 (33,3 %)	2 (16,7 %)	3 (25,0 %)
LA1	13	7 (53,8 %)	4 (30,8 %)	1 (7,7 %)	1 (7,7 %)
LA2	11	0	5 (45,5 %)	1 (9,1 %)	5 (45,5 %)
MTL	15	1 (6,7 %)	9 (60,0 %)	2 (13,3 %)	3 (20,0 %)

Nota: Os códigos dos centeios encontram-se descritos no Quadro 3.1

4.2- Marcadores Moleculares

4.2.1- RAPDs (Random Amplified Polymorphism DNA)

Dos 26 *primers* testados, descritos no ‘Material e Métodos’, foram seleccionados apenas 21, tendo sido excluídos os *primers* OPA6, OPB6, OPC8, OPC15 e OPC18 pela dificuldade na interpretação dos padrões obtidos, pela falta de reprodutibilidade observada e pela fraca amplificação de alguns deles. Os *primers* seleccionados, para além de possibilitar uma amplificação eficaz de bandas reprodutíveis, revelaram produtos bastante informativos e polimórficos (Quadro 4.2).

Foram registados 242 produtos de amplificação (bandas) onde 146 se mostraram polimórficos correspondendo a 60,33 % de polimorfismo em todo o material estudado. A média do número de bandas reprodutíveis registadas por *primer* foi de 11,52 variando entre o mínimo de 7 (OPC2) e o máximo de 21 (OPC13) bandas/*primer* e a média das bandas polimórficas/*primer* foi de 6,95 variando entre 1 e 20 bandas polimórficas/*primer* nos *primers* OPC6 e OPC13, respectivamente. Os tamanhos dos fragmentos variaram entre os 250 e os 2800 pb para os *primers* OPB10 e OPC13, respectivamente.

A taxa de polimorfismo variou entre 11,11 % para o *primer* OPC6 e 95,24 % para o *primer* OPC13. O elevado polimorfismo obtido com este *primer* demonstra a grande variabilidade genética existente nos genótipos de centeio em estudo, tal como aconteceu com o *primer* OPC7 (90,91 %).

Nas figuras 4.3 e 4.4 encontram-se dois exemplos de amplificação de dois *primers* de RAPDs onde se pode verificar a eficiência da amplificação e os diferentes graus de polimorfismo.

Para além disso, foi encontrado um total de 22 bandas únicas em 13 dos *primers* utilizados. O *primer* OPC13, mais uma vez sobressaiu devido ao número elevado de bandas únicas obtidas (Quadro 4.2).

Foi na espécie cultivada onde se obteve um maior número de bandas únicas destacando-se a linha pura Riodeva com cinco bandas únicas (Quadro 4.3)

Quadro 4.2: Resultados da amplificação e do polimorfismo de cada *primer* de *RAPD* seleccionado

<i>Primer</i>	Bandas reprodutíveis	Bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)	Bandas únicas	Variação do tamanho aproximado das bandas (pb)
<i>OPA01</i>	10	5	50,00	1	380 - 1400
<i>OPA04</i>	8	5	62,50	0	500 - 1400
<i>OPA05</i>	11	8	72,73	3	390 - 1900
<i>OPA17</i>	13	9	69,23	3	600 - 1750
<i>OPB01</i>	12	7	58,33	1	400 - 1400
<i>OPB05</i>	12	7	58,33	1	490 - 2000
<i>OPB07</i>	15	10	66,67	1	280 - 1700
<i>OPB10</i>	13	5	38,46	0	250 - 1950
<i>OPC01</i>	9	7	77,78	0	450 - 1500
<i>OPC02</i>	7	2	28,57	1	550 - 1100
<i>OPC04</i>	9	4	44,44	0	300 - 1750
<i>OPC05</i>	13	8	61,54	1	520 - 1700
<i>OPC06</i>	9	1	11,11	0	290 - 1400
<i>OPC07</i>	11	10	90,91	2	400 - 1750
<i>OPC09</i>	13	10	76,92	1	590 - 2100
<i>OPC11</i>	9	4	44,44	0	320 - 1250
<i>OPC12</i>	10	5	50,00	2	420 - 1500
<i>OPC13</i>	21	20	95,24	4	490 - 2800
<i>OPC16</i>	14	5	35,71	0	280 - 1500
<i>OPC19</i>	15	10	66,67	1	270 - 1600
<i>OPC20</i>	8	4	50,00	0	750 - 1800

Quadro 4.3: Bandas únicas obtidas em cada espécie através dos marcadores *RAPDs*

Espécie/Subespécie	Bandas únicas
<i>S. ancestrale</i>	1
<i>S. cereale</i>	13
<i>S. kuprijanovii</i>	3
<i>S. montanum</i>	2
<i>S. segetale</i>	2
<i>S. vavilovii</i>	1

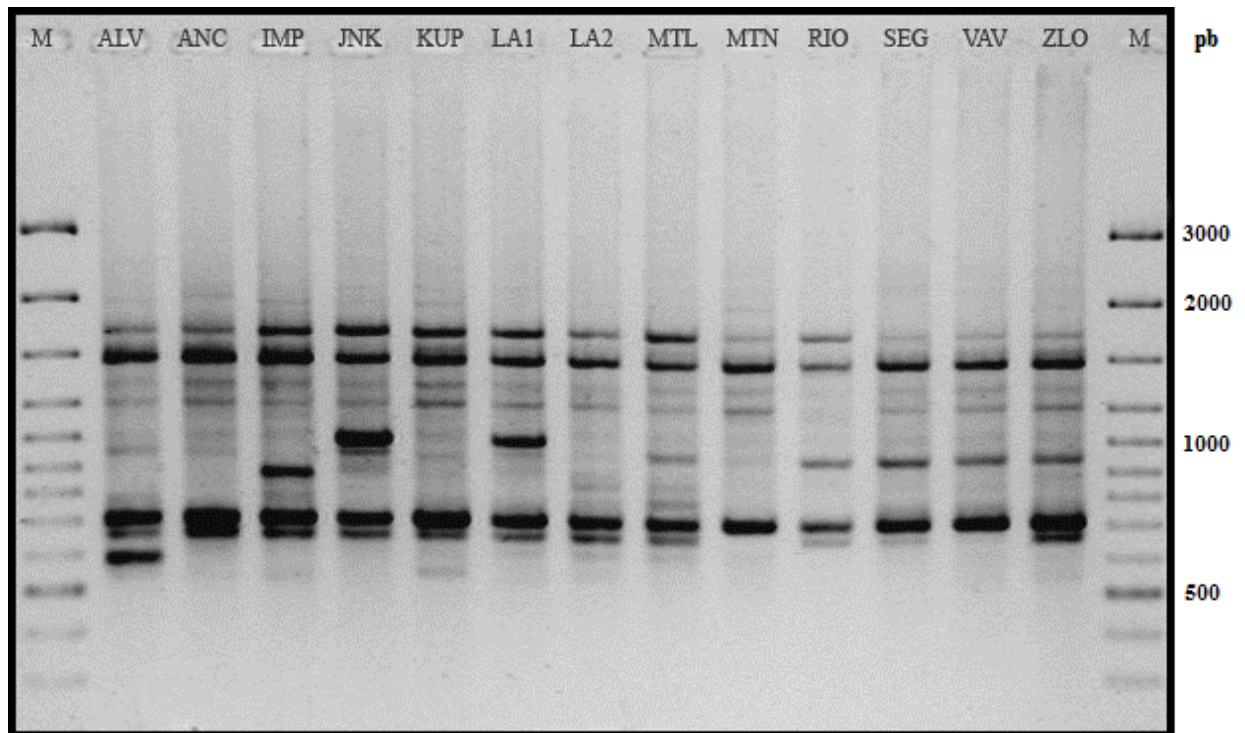


Figura 4.3: Fragmentos de DNA amplificados nos 13 centeios com o *primer* OPA17. M: marcador de peso molecular padrão de DNA (*GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder* - Fermentas).

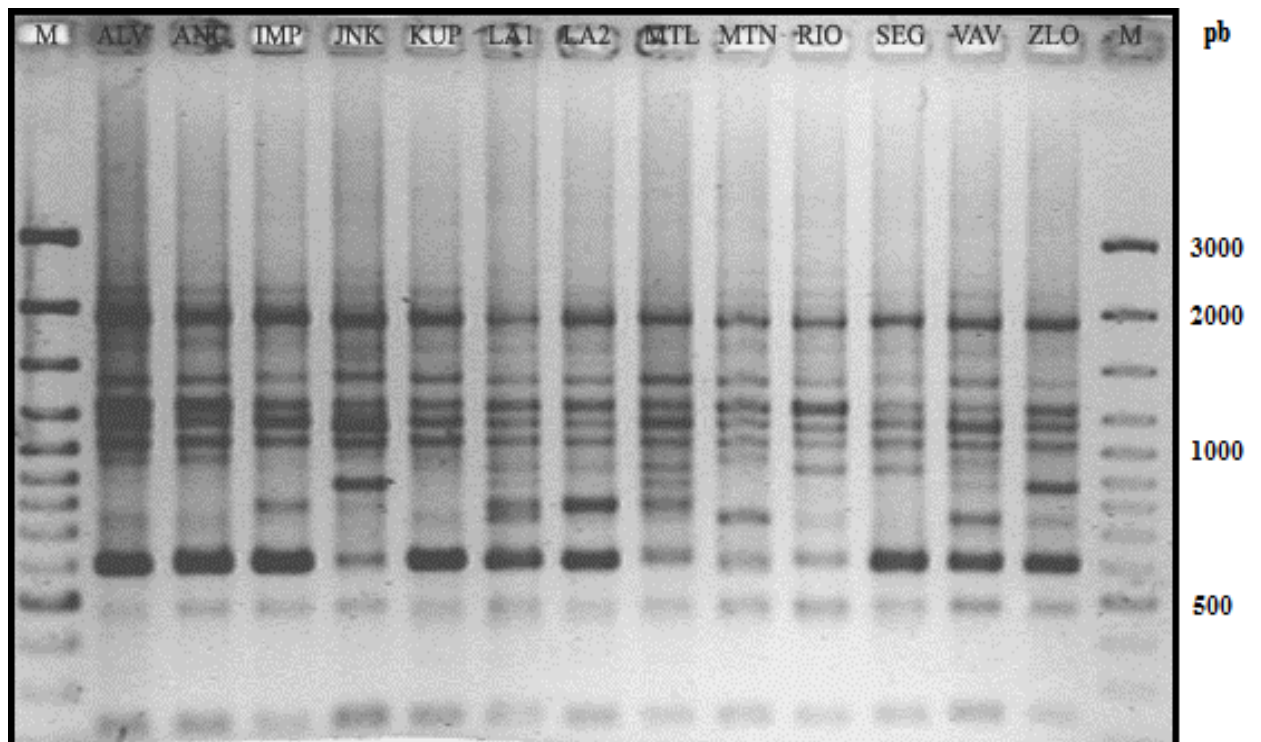


Figura 4.4: Fragmentos de DNA amplificados nos 13 centeios com o *primer* OPB10. M: marcador de peso molecular padrão de DNA (*GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder* - Fermentas).

4.2.2- ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats)

Tendo em atenção a reprodutibilidade, amplificação e grau de polimorfismo dos *primers* inicialmente testados seleccionaram-se os dezasseis apresentados no Quadro 4.4.

Com os *ISSRs* foi obtida uma maior taxa de polimorfismo do que com os *RAPDs*, atingindo os 76,17 % entre as amostras de centeio em estudo. No total foram obtidas 193 bandas reprodutíveis das quais 147 revelaram-se polimórficas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram entre os 320 e os 3000 pb. Nas figuras 4.6 (*UBC811*) e 4.7 (*UBC836*) encontram-se exemplos da eficiência da amplificação dos *primers* e do elevado grau de polimorfismo referente aos *ISSRs*.

A média do número de bandas reprodutíveis registadas por *primer* foi de 12,06 variando entre o mínimo de 6 (*UBC815*) e o máximo de 20 (*UBC842*) bandas/*primer* e a média das bandas polimórficas foi de 9,19 variando entre o mínimo de 3 (*UBC827* e *UBC835*) e o máximo de 16 (*UBC836* e *UBC842*) bandas polimórficas/*primer*.

A percentagem do polimorfismo variou entre 37,50 para o *primer UBC827* e 92,31 para o *primer UBC812*. O polimorfismo obtido foi de considerável dado que em mais de 50 % dos *primers* testados obteve-se mais de 70 % de polimorfismo.

O número de bandas únicas encontradas com os marcadores *ISSRs* (42 em 15 *primers*) foi o dobro do número de bandas obtidas com os *RAPDs* (22 em 13 *primers*). Enquanto com o *primer UBC815* não se detectou qualquer banda única, com o *UBC842* obtiveram-se cinco bandas (Quadro 4.4).

Assim como aconteceu com os marcadores *RAPDs*, também com os *ISSRs* a espécie cultivada (*S. cereale*) revelou mais bandas únicas. Dentro desta espécie destacaram-se a variedade JNK e, mais uma vez, a linha pura Riodeva, ambas com 14 bandas únicas (Quadro 4.5).

Quadro 4.4: Resultados da amplificação e do polimorfismo de cada *primer* de *ISSR* seleccionado

<i>Primer</i>	Bandas reprodutíveis	Bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)	Bandas únicas	Variação do tamanho aproximado das bandas (pb)
<i>UBC808</i>	16	13	81,25	4	420 - 2800
<i>UBC810</i>	14	10	71,43	4	650 - 2100
<i>UBC811</i>	15	13	86,67	3	620 - 2500
<i>UBC812</i>	13	12	92,31	3	590 - 2950
<i>UBC815</i>	6	4	66,67	0	420 - 1900
<i>UBC824</i>	10	8	80,00	1	880 - 1800
<i>UBC827</i>	8	3	37,50	1	780 - 1500
<i>UBC835</i>	7	3	42,86	2	620 - 1800
<i>UBC836</i>	19	16	84,21	4	720 - 3000
<i>UBC842</i>	20	16	80,00	5	320 - 2000
<i>UBC844</i>	9	8	88,89	2	400 - 2600
<i>UBC845</i>	9	6	66,67	2	900 - 2000
<i>UBC846</i>	12	10	83,33	3	900 - 2500
<i>UBC881</i>	15	12	80,00	4	980 - 2800
<i>UBC889</i>	12	9	75,00	3	660 - 1600
<i>UBC891</i>	8	4	50,00	1	750 - 1150

Quadro 4.5: Bandas únicas obtidas em cada espécie através dos marcadores *ISSRs*

Espécie/Subespécie	Bandas únicas
<i>S. ancestrale</i>	1
<i>S. cereale</i>	32
<i>S. kuprijanovii</i>	3
<i>S. montanum</i>	1
<i>S. segetale</i>	3
<i>S. vavilovii</i>	2

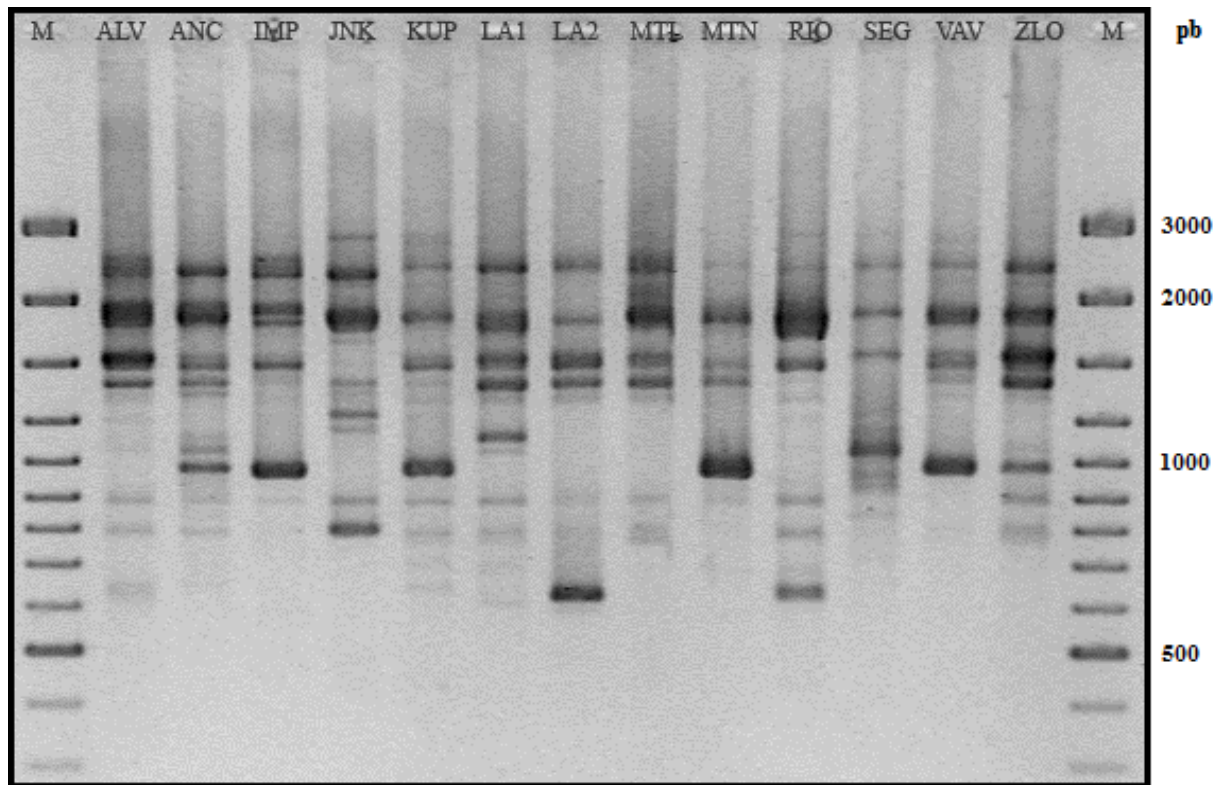


Figura 4.5: Fragmentos de DNA amplificados nos 13 centeios com o *primer UBC811*. M: marcador de peso molecular padrão de DNA (*GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder* - Fermentas).

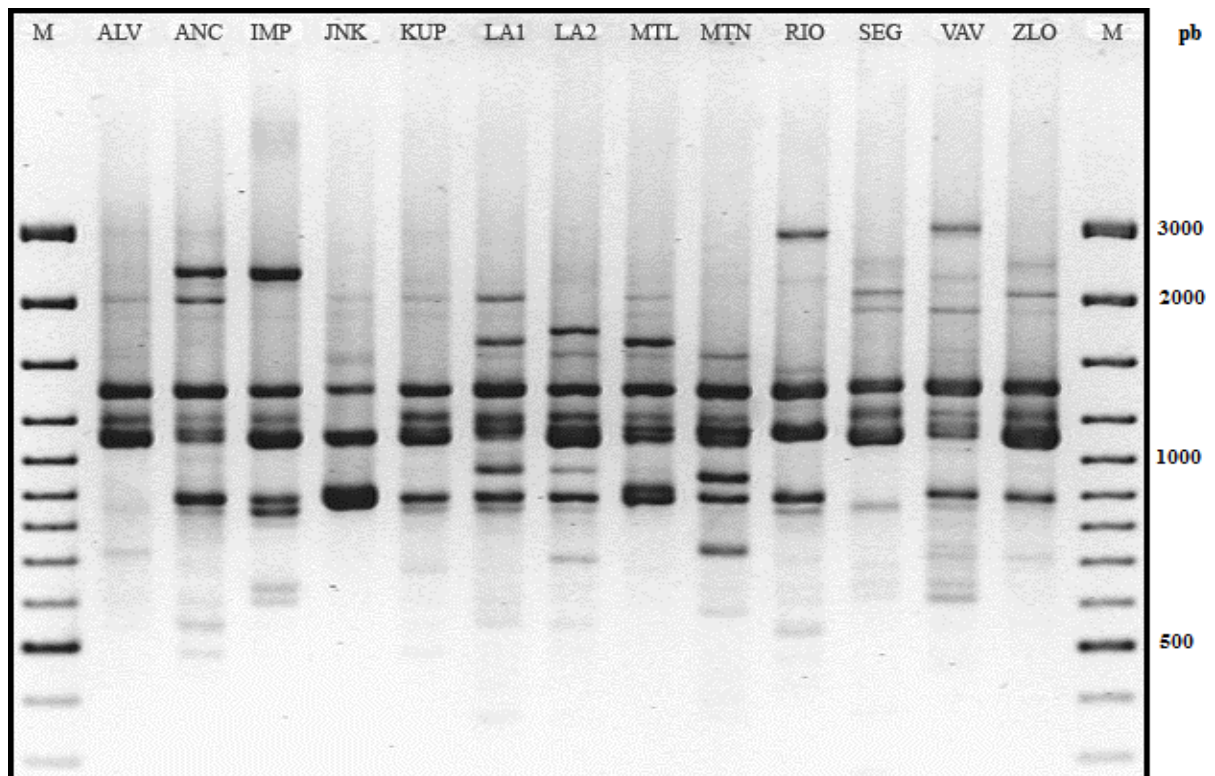


Figura 4.6: Fragmentos de DNA amplificados nos 13 centeios com o *primer UBC836*. M: marcador de peso molecular padrão de DNA (*GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder* - Fermentas).

4.2.3- Análise filogenética

Os resultados obtidos em *RAPDs* e *ISSRs* (Quadros 4.3 e 4.5) foram utilizados para construir matrizes de dados binários (1- presença e 0- ausência). Posteriormente, foram elaborados os dendrogramas respectivos aplicando o método UPGMA e usando o coeficiente SM.

Inicialmente, fez-se um dendrograma só com os dados dos marcadores *RAPDs* (figura 4.7) e outro só com os dados dos marcadores *ISSRs* (figura 4.8) e, no final, combinaram-se as matrizes dos dois marcadores (figura 4.9).

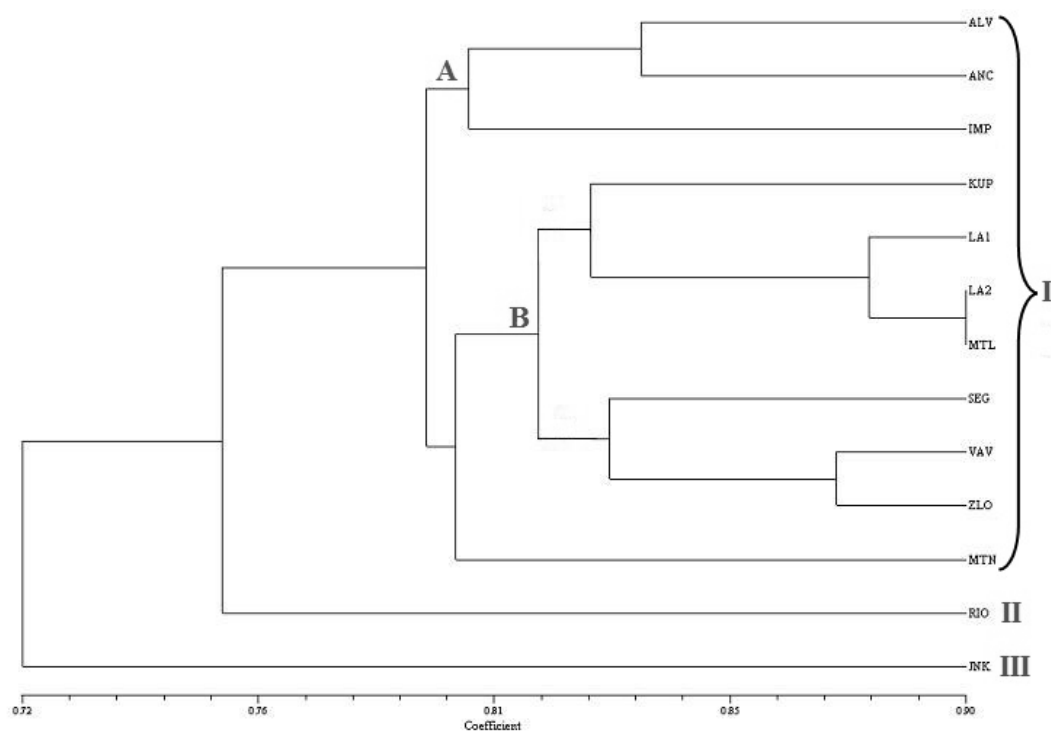


Figura 4.7: Dendrograma com as relações filogenéticas entre os treze centeios em estudo com base nos marcadores *RAPDs* aplicando o método UPGMA e o coeficiente SM

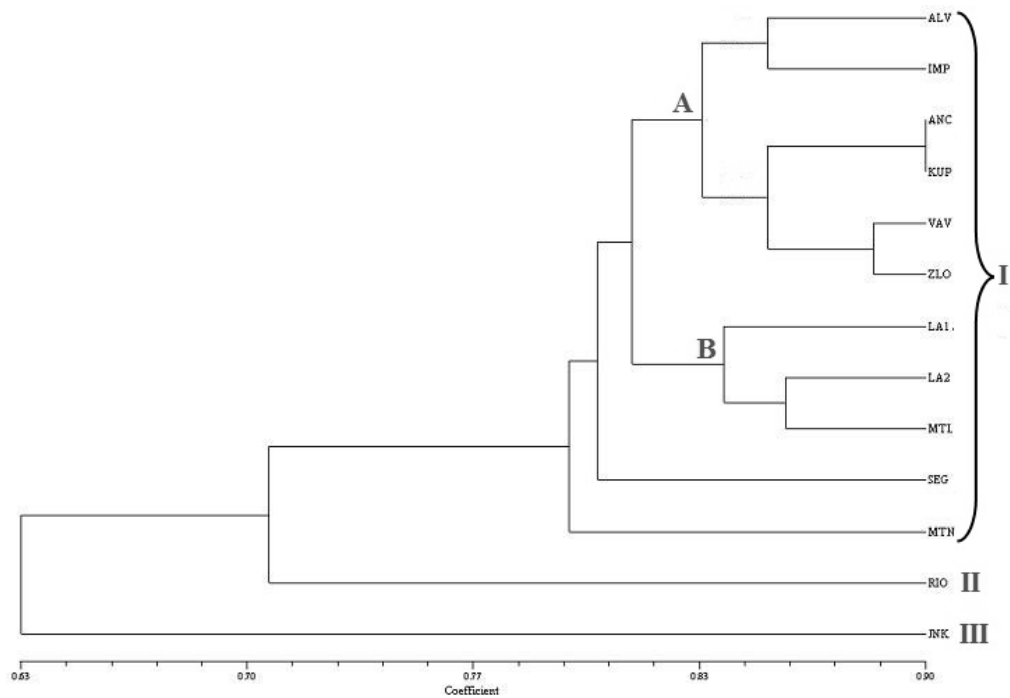


Figura 4.8: Dendrograma com as relações filogenéticas entre os treze centeios em estudo com base nos marcadores *ISSRs* aplicando o método UPGMA e o coeficiente SM

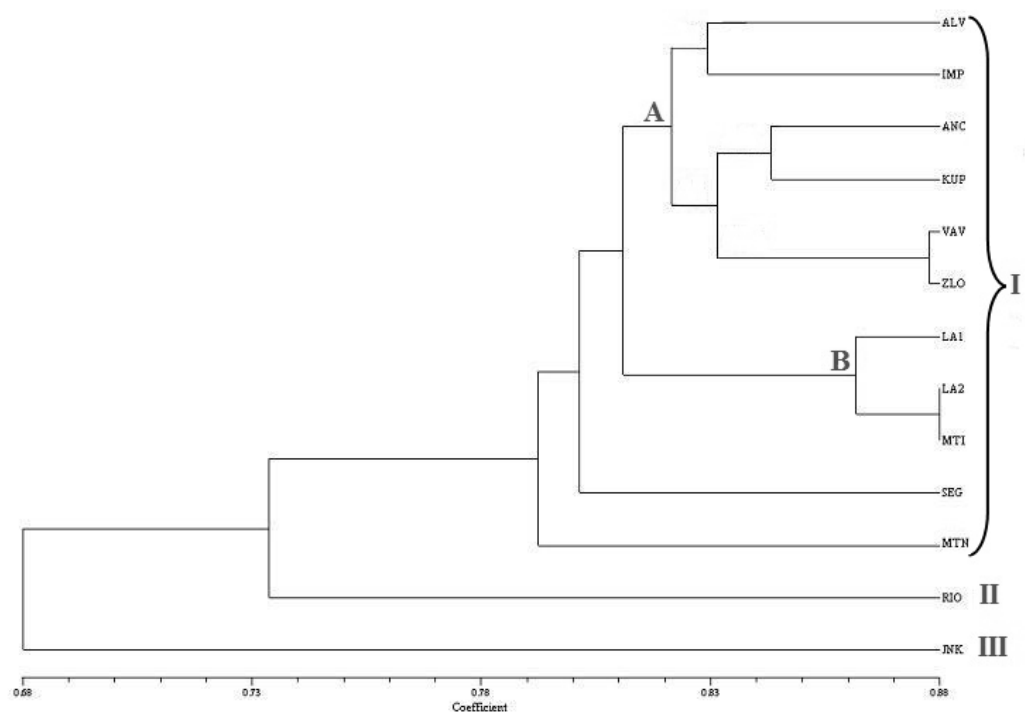


Figura 4.9: Dendrograma com as relações filogenéticas entre os treze centeios em estudo com base na união dos marcadores *ISSRs* e *RAPDs* aplicando o método UPGMA e o coeficiente SM

De uma forma geral, os três dendrogramas obtidos são muito semelhantes. Houve sempre a formação de um grupo principal e duas amostras divergentes, a linha pura Riodeva e a variedade JNK.

As linhas da população regional de Lamego (LA1 e LA2) e a população regional de Montalegre ficaram sempre agrupadas assim como os cultivares Alvão e Imperial. A variedade Dankowskie Zlote esteve sempre junto da espécie silvestre *S. vavilovii*.

O centeio silvestre *S. montanum* inseriu-se, nos três casos, dentro do agrupamento principal. No entanto, manteve-se isolada do resto dos centeios do grupo. As principais diferenças ocorreram com as espécies *S. ancestrale*, *S. kuprijanovii* e *S. segetale*, todas elas silvestres.

O maior factor de similaridade foi obtido com os centeios silvestres *S. ancestrale* e *S. kuprijanovii* (0,90) com os marcadores *ISSRs* e com a linha da população de Lamego (LA1) e a população Montalegre (0,90), desta vez, com os marcadores *RAPDs*. Foi com os marcadores *ISSRs* que se obteve o menor factor de similaridade (JNK – 0,63).

Apesar de se ter detectado uma grande variabilidade genética entre as diferentes espécies e dentro da mesma espécie, o factor de similaridade mínimo obtido foi bastante elevado: 0,63, 0,72 e 0,68 para os *ISSRs*, *RAPDs* e *ISSRs+RAPDs*, respectivamente.

4.3- Análise dos exões do gene *AACT1 (MATE1)*

A partir das sequências dos 3 exões (1, 4 e 8) do gene *MATE*, obtidas em plantas tolerantes e sensíveis, de treze espécies/subespécies/variedades/populações, foram efectuadas diferentes análises, tendo em conta a grande variedade de material em estudo.

As sequências foram devidamente tratadas, no sentido de se obterem exclusivamente as sequências dos exões (os *primers* escolhidos foram desenhados fora das sequências dos exões) e sem indeterminações. Todas as sequências foram alinhadas, como o exemplo representado na figura 4.10 e foi detectada a existência de vários *SNPs* e *INDELs*.

A primeira análise foi a comparação das plantas tolerantes e sensíveis da mesma espécie/subespécie/variedade/população.

Verificou-se que, na maioria dos casos, não existiam diferenças significativas, não sendo possível relacionar as diferenças observadas com tolerância ou sensibilidade. A

excepção foi o caso do *S. vavilovii* sensível com o exão 1 em que não foi possível sequenciar directamente o produto obtido. Procedeu-se à clonagem deste fragmento e posterior sequenciação e foram detectadas duas cópias deste exão.

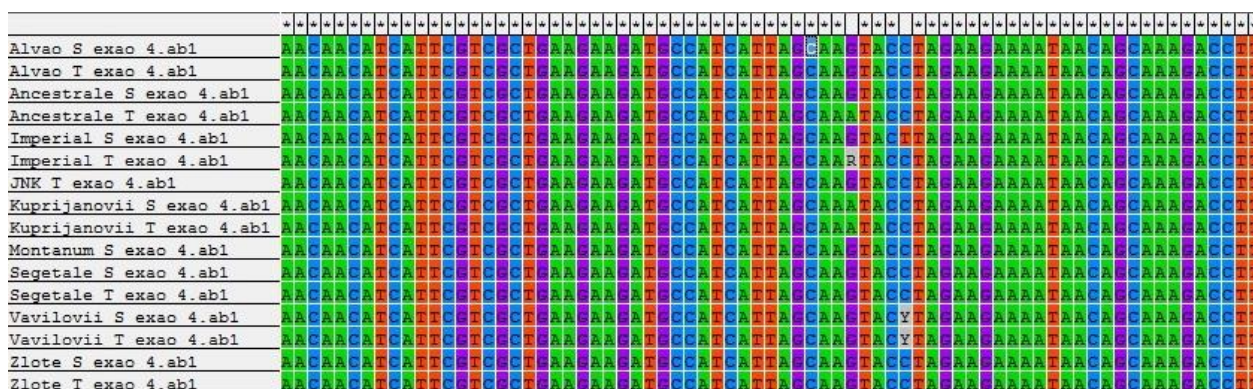


Figura 4.10: Parte de um alinhamento obtido com o exão 4

Efectuou-se a comparação para detecção de diferenças de todas as sequências simultaneamente (Quadro 4.6), depois analisaram-se as sequências dos centeios cultivados (Quadro 4.7) e, por fim, a comparação das sequências de uma planta de cada espécie do género *Secale* (Quadro 4.8).

Quadro 4.6: Análise utilizando todos os dados

Exon	Lenght	SNP	SNP/100	INDEL	Het	CNST	CNSAC
1	195-201	22	11,28	2	12	13	3
4	196	25	12,75	0	13	4	1
8	166	16	9,64	0	9	2	0

SNP - Single nucleotide polymorphism; INDEL - Insertion-deletion polymorphism; Het - Heterozygous position; CNST - Total Non-synonymous changes; CNSAC - Non-synonymous changes with electric charge change.

Quadro 4.7: Análise das sequências dos cultivares de *S. cereale*

Exon	Lenght	SNP	SNP/100	INDEL	Het	CNST	CNSAC
1	195-201	9	4,61	2	8	7	3
4	196	9	4,59	0	6	3	1
8	166	14	8,43	0	9	1	0

SNP - Single nucleotide polymorphism; INDEL - Insertion-deletion polymorphism; Het - Heterozygous position; CNST - Total Non-synonymous changes; CNSAC - Non-synonymous changes with electric charge change.

Quadro 4.8: Análise das sequências do género *Secale*

Exon	Lenght	SNP	SNP/100	INDEL	Het	CNST	CNSAC
1	195-201	22	11,28	2	12	13	3
4	196	25	12,75	0	13	4	1
8	166	16	9,64	0	9	2	0

SNP - Single nucleotide polymorphism; **INDEL** - Insertion-deletion polymorphism; **Het** - Heterozygous position; **CNST** - Total Non-synonymous changes; **CNSAC** - Non-synonymous changes with electric charge change.

Da análise dos três quadros é de salientar o elevado grau de variabilidade existente nas sequências estudadas. O exão que apresenta maior variabilidade varia com as sequências comparadas: o exão 1 no caso dos centeios cultivados e o exão 4 quando se analisa um representante de cada espécie do género *Secale*.

É de salientar o caso do exão 1 que em todos os estudos efectuados apresenta uma elevada variabilidade (elevado número de *SNPs*) e o único com *INDELs*. Os *INDELs* detectados no exão 1 resultam numa alteração na proteína com a presença de mais dois aminoácidos.

5- Discussão

5.1- Tolerância ao alumínio

A acidez dos solos é um problema que abrange uma grande área mundial e é um dos principais factores que limitam a produção vegetal. A toxicidade do alumínio encontra-se associada com a problemática devido à disponibilidade deste elemento nos solos na sua forma solúvel Al^{3+} . Para tentar minimizar estes problemas têm sido desenvolvidos programas de melhoramento genético para a obtenção de genótipos tolerantes ao alumínio. Torna-se assim importante caracterizar e seleccionar espécies tolerantes com melhor adaptação aos solos ácidos.

Existem várias técnicas para testar a tolerância ao Al como a cultura em solução nutritiva, a cultura de células e tecidos, os bioensaios em solos e a avaliação em campo. A análise de recrescimentos radiculares a partir de cultura em solução nutritiva, aplicada neste trabalho, é o método mais usado pelas diversas vantagens que apresenta tais como: a facilidade em aceder ao sistema radicular sem destruir a planta; o controlo de todas as condições experimentais (disponibilidade de nutrientes, concentração do Al e níveis de pH); a análise de uma grande quantidade de plantas em simultâneo e a fiabilidade para a investigação sobre os mecanismos genéticos envolvidos na tolerância ao Al (Matos, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Com esta metodologia, tivemos possibilidade de analisar, simultaneamente e de forma rápida, todo o material vegetal em estudo garantindo assim as mesmas condições de ensaio.

Como já foi referido na parte introdutória do trabalho, o primeiro sintoma da toxicidade ao Al é a inibição do crescimento radicular, ou seja, a falta de recrescimentos quando a planta é transferida para uma solução sem Al, após a permanência numa solução com este elemento durante 48h.

Os recrescimentos das plântulas foram devidamente observados devido à acção do corante utilizado, o Eriochrome cyanine R. Este corante tem a capacidade de formar complexos corados com as partes das raízes que contêm Al permitindo assim a observação imediata do recrescimento das raízes, após a exposição ao Al. Portanto,

entende-se por recrescimento a distância entre o ápice das raízes e o limite da parte corada.

Quando as plantas são afectadas pelo Al não se verificam recrescimentos pois o ápice das raízes encontra-se corado. Por outro lado, quando as plantas não são afectadas pela presença do Al, observam-se recrescimentos que corresponde à parte marcada pelo corante.

São muitos os autores que utilizaram este corante nos seus trabalhos de selecção da tolerância ao Al (Ślaski, 1994; Aniol, 1996; Gallego e Benito, 1997; Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 2000; Fontecha *et al.*, 2007) embora outros tenham utilizado a hematoxilina (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1995, 1999). Em 1997, Ma *et al.* não verificaram diferenças significativas quando efectuaram de tolerância ao Al, utilizando ambos os corantes.

Entre os cereais, o centeio é aquele que se tem revelado mais tolerante à presença do Al. Ślaski (1994), Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1999) e Li *et al.* (2000) comprovaram que o centeio é mais tolerante que o trigo e Ma *et al.* (1997) não conseguiram encontrar linhas de cevada tão tolerantes como a linha mais tolerante de trigo (Atlas 66). Por outro lado, Kim *et al.* (2001) mostraram que a tolerância ao Al do triticales (*xTriticosecale* Wittmack) se deve ao genoma do centeio e não ao do trigo. Estes factos convertem o centeio num potencial recurso para ser usado em programas de melhoramento genético e daqui advém a sua importância em estudos de tolerância a este metal.

Portugal é um país bastante afectado pela acidez dos solos sendo a zona Norte do país a mais atingida por esta característica (APA, 2010, www.apambiente.pt). Na agricultura portuguesa ainda tem alguma importância o cultivo de cereais e o centeio tem uma grande expansão no Norte do país onde várias populações, como o Alvão, Lamego e Montalegre, analisadas neste estudo, têm sido cultivadas..

Segundo Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1995) existe uma grande variabilidade na tolerância ao Al entre populações regionais de centeio. As populações regionais de centeio que têm sido cultivadas durante longos anos em solos ácidos parecem ter desenvolvido, de uma forma natural, variabilidade genética para a tolerância ao Al, adaptando-se assim às condições locais (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1995; Matos, 2006).

As duas linhas (LA1 e LA2) usadas como testemunhas, neste trabalho, foram obtidas a partir da selecção de plantas para a sensibilidade e tolerância da população de

Lamego. A linha LA1 revelou-se sensível à toxicidade do Al com apenas 0,79 mm de média de recrescimentos enquanto a população LA2 se revelou tolerante à presença de Al à concentração de 10 ppm com 3,73 mm de média de recrescimentos. O centeio LA1 alcançou 53,8 % de plantas sem recrescimentos enquanto o LA2 não obteve qualquer planta sem recrescimento. Os valores da média dos comprimentos radiculares obtidos por estas duas populações não foram muito diferentes (LA1 – 33,31 mm e LA2 – 31,91 mm).

A linha pura Riodeva, proveniente de Espanha, tem sido caracterizada pela sua elevada sensibilidade e, por isso, tem sido utilizada como testemunha sensível (Gallego e Benito, 1997; Matos *et al.*, 2005; Matos, 2006). Neste estudo não apresentou qualquer recrescimento radicular em nenhuma das plantas testadas alcançando assim 100 % de recrescimentos nulos e apresentou comprimentos radiculares baixos (30,89 mm). Confirma-se assim a elevada sensibilidade desta linha consanguínea e o seu valor como testemunha neste tipo de ensaio.

A variedade Dankowskie Zlote, que é considerada uma cultivar tolerante ao Al e de grande peso na cultura cerealífera polaca (Pinto-Carnide, 1990), obteve comprimentos radiculares elevados (56,33 mm). Contudo, apresentou apenas 1,31 mm de média de recrescimentos e 20 % das plantas com recrescimentos nulos. A maioria das plantas (53,3 %) registou recrescimentos baixos, na classe 0 – 1,5 mm. Esta variedade, embora utilizada como testemunha foi, dentro da espécie cultivada, aquela que se revelou menos tolerante. Em estudos de tolerância ao Al em amostras de centeio de diferentes localidades (Brasil e Equador), Kim *et al.* (2001) também obtiveram recrescimentos superiores aos da variedade Dankowskie Zlote.

Entre as testemunhas usadas, o centeio Riodeva revelou-se mais sensível que o centeio LA1 enquanto o centeio LA2 se mostrou mais tolerante que o centeio Dankowskie Zlote. A elevada tolerância das populações regionais de centeio comparativamente a outras variedades europeias foi igualmente comprovado por Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (2000), onde a 30 e 40 ppm de Al as populações de centeio portuguesas se revelaram mais tolerantes que as cultivares europeias.

As populações de Montalegre e Alvão demonstraram um bom comportamento na tolerância ao Al, com uma média de recrescimentos de 3,04 e 2,61 mm, respectivamente. Estas duas populações revelaram ser mais tolerantes do que a testemunha tolerante Dankowskie Zlote. Contudo, a linha LA2, usada como testemunha, teve um melhor comportamento do que estas duas populações. Isto vem

realçar a eficiência da metodologia usada na selecção de duas linhas a partir de populações regionais de Lamego. Conseguiu-se, ao fim de seis gerações, obter uma linha bastante tolerante (LA2), e outra linha (LA1) que, embora ainda não tenha a característica fixada, revela já uma elevada sensibilidade, tendo-se apenas obtido 15,4 % de plantas com recrescimentos consideráveis.

Pinto-Carnide (1990) e Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1995) verificaram que, à concentração de 10 ppm, o centeio de Lamego registou um comportamento mais tolerante do que o centeio de Montalegre e que, tal como neste trabalho, demonstraram um melhor comportamento que a testemunha Dankowskie Zlote.

Pinto-Carnide (1990) não obteve qualquer planta sem recrescimentos nas populações de Lamego e Montalegre. Matos (2006) comprovou, igualmente, a tolerância ao Al das populações de Lamego e de Montalegre, à concentração de 30 ppm. Estes resultados são concordantes com Pinto-Carnide (1990) e Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (1995, 1999). Com concentrações mais elevadas de Al (60 e 80 ppm), Pinto-Carnide (1990) verificou que os valores dos recrescimentos eram bastante baixos. Contudo, as populações regionais de Lamego e Montalegre obtiveram sempre valores superiores à testemunha tolerante Dankowskie Zlote.

Dentro da espécie cultivada *Secale cereale*, para além das populações regionais portuguesas, foram também estudadas duas variedades estrangeiras: Imperial e JNK. Estas variedades revelaram um bom comportamento à tolerância ao Al registando 14,21 e 5,33 mm de média de recrescimentos. Estes dois centeios, além de não apresentarem nenhuma planta sem recrescimentos, alcançaram valores de recrescimentos superiores às populações regionais portuguesas (Alvão e Montalegre) e às testemunhas tolerantes. Possuindo o centeio JNK além do complexo cromossómico normal, cromossomas supranumerários designados de cromossomas B (Schlegel e Pohler, 1994), poder-se-á inferir da influência destes cromossomas nesta característica. Este facto torna estas duas variedades muito importantes como fontes de germoplasma sendo importante continuar este tipo de estudos para avaliar o efeito deste tipo de cromossomas e caracteres relacionados com stresses abióticos e outros. Estes dois centeios provêm de regiões que se destacam por conter solos bastante ácidos como o Sudeste Asiático – Japão (JNK) e a América do Norte – Canadá (Imperial) e, por esta razão, podem ter desenvolvido mecanismos de tolerância ao Al.

Gallego e Benito (1997) também comprovaram a elevada tolerância ao Al da variedade japonesa JNK.

Dado que não existem dados sobre o comportamento das espécies silvestres relativamente à tolerância ao Al, incluíram-se neste estudo cinco espécies/subespécies silvestres, nomeadamente, *S. ancestrale*, *S. kuprijanovii*, *S. montanum*, *S. segetale* e *S. vavilovii*).

O *S. vavilovii* destacou-se por se revelar, à excepção do JNK, o centeio mais tolerante. Este centeio conseguiu alcançar uma média de 12,82 mm de recrescimentos atingindo 86,70 % das plantas, raízes com recrescimentos superiores a 3,50 mm. Para além disso, esta espécie também alcançou os valores mais elevados de média de comprimentos radiculares (77,40 mm). Sendo esta espécie autogâmica pode constituir um material importante para estudos genéticos dada a maior facilidade de fixação desta característica.

S. montanum revelou um comportamento oposto com 75 % das plantas com recrescimentos nulos. Entre os centeios silvestres foi o que se revelou mais sensível ao Al atingindo apenas 0,08 mm da média dos recrescimentos. Esta espécie, exceptuando testemunha sensível Riodeva, obteve os valores mais baixos de comprimentos radiculares com 24,36 mm. Este centeio encontra-se, geralmente, em encostas secas, rochosas e pedregosas (Oram, 1996) não estando, por isso, adaptado aos solos ácidos e daí poder provir a sua elevada sensibilidade à presença do Al.

O *S. kuprijanovii* foi, dentro dos centeios silvestres, o segundo centeio mais tolerante, alcançando 6,02 mm de média de recrescimentos com 40 % das plantas com valores superiores a 3,50 mm. O *S. ancestrale* apenas apresentou uma planta sem recrescimentos e registou uma média de recrescimentos de 3,82 mm.

De uma maneira geral, à excepção do *S. montanum*, todos os centeios selvagens se mostraram mais tolerantes que as testemunhas tolerantes. Pode-se então inferir da elevada tolerância encontrada nas espécies silvestres de centeio revelando-se de grande importância para a introgressão do seu material genético e melhoramento das espécies cultivadas e seu melhoramento para introdução em solos ácidos.

Os recrescimentos radiculares são um parâmetro importante para avaliar a tolerância ao alumínio em várias espécies vegetais como o centeio (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 2000; Kim *et al.*, 2001), o trigo (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1995; Karsai e Bedö, 1998; Kim *et al.*, 2001), o tritcale (Pinto-Carnide *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2001) e a cevada (Ma *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2006). O seu comportamento em laboratório dá-nos ideia da sua capacidade para crescer em solos ácidos (Polle *et al.*, 1978). As diferentes classes de recrescimentos obtidas são indicadoras da enorme

variabilidade existente no centeio. À excepção do *S. vavilovii*, os centeios deste estudo são todos alogâmicos, portanto, na sua grande maioria, heterozigóticos, o que leva à existência de uma grande diversidade de genótipos pelo que se encontram umas plantas sensíveis e outras tolerantes ao Al (Quadro 4.1).

Com este estudo conseguiu-se comprovar a grande variabilidade existente no centeio já comprovado por outros autores (Pinto-Carnide, 1990; Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1995, 1999, 2000; Kim *et al.*, 2001). Verificou-se a existência de variabilidade intraespecífica e interespecífica. Esta variabilidade também foi encontrada noutras espécies relacionadas como no trigo (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1999; Kim *et al.*, 2001), no tritcale (Pinto-Carnide e Guedes-Pinto, 1990; Kim *et al.*, 2001) e na cevada (Wang *et al.*, 2006).

O germoplasma estudado revela-se de extrema importância para programas de melhoramento de centeio, onde os genótipos tolerantes poderão ser seleccionados como um potencial recurso de genes para introgressão em trigo, que tem um comportamento mais sensível, ou inclusão no tritcale ou outras espécies relacionadas como a cevada.

5.2- Marcadores Moleculares

Nas últimas duas décadas, os marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados na detecção de genes, em estudos de genética molecular, de diversidade genética, de melhoramento genético e de genética das populações revolucionando assim a biologia (Biswas *et al.*, 2010). Tal facto deve-se às inúmeras vantagens que estes marcadores apresentam como, a sua ubiquidade, facilidade e rapidez no seu desenvolvimento, o seu baixo custo, entre outras. Os dados moleculares têm-se mostrado muito mais eficazes do que os dados fisiológicos e morfológicos fazendo com que os marcadores moleculares sejam, em alguns casos, preferidos aos marcadores bioquímicos e morfológicos.

Os *RAPDs* e os *ISSRs* são dois marcadores moleculares baseados na técnica da *PCR* que têm ganho cada vez mais aceitação. O facto de não necessitarem de informação prévia acerca das sequências alvo, de precisarem apenas de uma quantidade mínima de gDNA, de serem fiáveis, eficientes, rápidos e fáceis de aplicar tem contribuído muito para este aumento. Foi por estas razões que estes marcadores foram seleccionados para o estudo da variabilidade genética entre os centeios.

Neste trabalho, foram efectuados *bulks* genéticos em cada espécie/variedade/população de centeio em estudo. Os *bulk* genéticos consistem na formação de uma solução de trabalho de gDNA, por cada espécie/subespécie/variedade/população, que contém uma mistura da mesma quantidade de gDNA de todas as plantas de cada centeio.

Com a utilização de amostras de *bulks* de DNA para a obtenção de marcadores *RAPDs* e *ISSRs*, pode ser amplificada uma mistura de sequências com diferentes graus de homologia com o *primer*. A quantidade final de amplificações obtida passa a depender da frequência de sequências contidas no *bulk*. A competição entre as sequências depreende, que apenas um número reduzido de sequências possíveis são efectivamente resolvidas, em bandas definidas no gel. Esta competição ocorre, também, na amplificação do DNA de uma planta individual mas, numa menor dimensão, devido ao baixo número de sequências homólogas ao *primer* (Loarce *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 2001).

O padrão dos fragmentos obtido numa cultivar será composto pelos fragmentos amplificados de sequências altamente representadas na amostra do *bulk* e que, portanto, se encontram nas plantas individuais. Por outro lado, as sequências que são raras na amostra do *bulk* de DNA terão uma maior probabilidade de ser amplificadas na análise do DNA de plantas individuais. Portanto, duas cultivares cujas diferenças estão relacionadas com sequências pouco representadas irão mostrar uma elevada similaridade quando são usados *bulk* de DNA em comparação ao obtido na análise de plantas individuais. No entanto, o oposto irá ocorrer para dois cultivares distantes, pois, dois cultivares cujas similaridades se reduzem a sequências pouco representadas irão mostrar uma menor distância genética quando se fazem *bulks* de DNA do que quando se estudam as plantas individuais (Loarce *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 2001).

A análise de *bulks* é bastante económica e rápida. Contudo, não é possível obter informação acerca da variabilidade genética existente dentro das populações, apenas se conseguindo avaliar a diversidade genética entre diferentes populações (Matos *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002). Quando se pretende analisar um grande número de amostras de plantas, como acontece neste estudo, a elaboração de *bulks* é um método bastante eficaz para estudos de diversidade genética de grande escala (Tanyolac, 2003). Foram vários os autores (Loarce *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Tanyolac, 2003; Muthusamy *et al.*, 2008) que utilizaram *bulks* nos seus estudos e que comprovaram a sua eficácia e utilidade. Para a fase inicial deste estudo é de grande

utilidade fazer *bulks* de DNA, pois, apenas se pretende avaliar a variabilidade genética existente entre os centeios em estudo e analisar as distâncias genéticas.

5.2.1- Polimorfismo dos marcadores moleculares

Uma característica que tem sido destacada nos marcadores *RAPDs* e *ISSRs* é a sua natureza polimórfica. O polimorfismo revela-se de extrema importância, pois indica a variação existente entre diferentes cultivares sejam eles da mesma espécie ou de espécies diferentes. Logo, a presença de polimorfismo é essencial nos estudos de variabilidade genética como é o caso deste trabalho.

Nos centeios em estudo, foram encontrados valores bastante elevados de polimorfismo tanto com os marcadores *RAPDs* (60,33 %) como com os marcadores *ISSRs* (76,17%). Os treze centeios (cinco espécies silvestres e oito populações/variedades cultivadas) obtiveram-se 435 marcadores de *PCR* (242 *RAPDs* e 193 *ISSRs*) onde 293 se revelaram polimórficos (146 *RAPDs* e 147 *ISSRs*). Os marcadores *ISSRs* apresentaram-se mais polimórficos que os marcadores *RAPDs*.

Tal facto foi, igualmente, comprovado por Raina *et al.* (2000), Matos *et al.* (2001), Fernández *et al.* (2002) e Tanyolac (2003), também em estudos de relações filogenéticas e/ou de diversidade genética em amendoim, centeiro, cevada e cevada silvestre, respectivamente.

Matos *et al.* (2001) obtiveram 82 % de polimorfismo nos marcadores *ISSRs* e apenas 36 % nos marcadores *RAPDs* em estudos de relações filogenéticas entre centeios portugueses, enquanto Fernández *et al.* (2002) obtiveram 83 % de polimorfismo nos marcadores *ISSRs* e apenas 63 % de polimorfismo nos marcadores *RAPDs* em estudos de diversidade genética de cultivares de cevada. Os valores de polimorfismo obtidos por estes autores não foram muito discrepantes dos que foram obtidos neste trabalho à excepção do valor dos marcadores *RAPDs* (36 %) dos autores Matos *et al.* (2001) que foi bastante inferior. Isto pode justificar-se porque estes autores fizeram um estudo de diversidade genética entre populações de centeiro cultivado enquanto neste estudo se estudaram espécies diferentes do género *Secale*.

Tanyolac (2003) fez estudos de variabilidade genética entre populações da espécie de cevada selvagem (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) e apenas conseguiu obter 27 e 32 % de polimorfismo com os marcadores *RAPDs* e *ISSRs*, respectivamente. A

diferença de polimorfismo entre os dois marcadores não é muito discrepante apesar dos *ISSRs* se revelarem mais polimórficos. Contudo, há que ter em atenção que o número de *primers* de *RAPDs* (22) é bastante superior ao número de *primers* de *ISSRs* (4). Raina *et al.* (2000) também alcançaram valores mais baixos de polimorfismo com os mesmos marcadores, tendo obtido 42,70 % de polimorfismo com *RAPDs* com um número semelhante de *primers* (21) e 54,40 % com *ISSRs* com um número superior de *primers* (29) na determinação da diversidade genética e das relações filogenéticas de cultivares e espécies selvagens de amendoim.

No entanto, também houve casos onde os marcadores *RAPDs* se revelaram mais polimórficos que os marcadores *ISSRs* (Muthusamy *et al.*, 2008 e Biswas *et al.*, 2010). Ao estudar a variabilidade genética de espécies diferentes do género *Citrus*, Biswas *et al.* (2010) conseguiram valores elevados de polimorfismo com apenas seis *primers* tanto de *RAPDs* (92,11 %) como de *ISSRs* (84,85 %). Por sua vez, Muthusamy *et al.* (2008) alcançaram 70,30 % de polimorfismo nos marcadores *RAPDs* e apenas 61,79 % nos marcadores *ISSRs* ao analisar a variação genética de populações de *Vigna umbellata*. Contudo, estes autores utilizaram o dobro de *primers* de *RAPDs* (74) em comparação com os *primers* de *ISSRs* (37) utilizados, sendo também uma grande discrepância em relação ao número de *primers* utilizados neste trabalho, tendo em conta que se alcançou uma percentagem de polimorfismo muito similar.

Em estudos de diversidade genética entre amostras de centeio, os marcadores *ISSRs* são escassos havendo mais informação através dos marcadores *RAPDs*. Ma *et al.* (2004) alcançaram 67,16 % de polimorfismo com 27 *primers* de *RAPDs*. No entanto, o valor de bandas polimórficas/*primer* foi inferior ao constatado neste estudo. Loarce *et al.* (1996) com um número mais elevado de *primers* de *RAPDs* (33) apenas conseguiram 45 % de polimorfismo. Persson *et al.* (2001), com apenas quinze *primers*, conseguiram encontrar marcadores *RAPDs* com 68,90 % de polimorfismo entre cultivares de centeio e Iqbal e Rayburn (1994) obtiveram entre 9 a 72 % de polimorfismo.

Neste estudo, encontraram-se 22 bandas únicas com treze *primers* de *RAPDs* e 42 bandas únicas com quinze *primers* de *ISSRs* nas seis espécies estudadas. As bandas únicas revelam-se de grande importância pois podem ser convertidas em marcadores STS podendo assim detectar polimorfismos e *fingerprints* de DNA. Matos *et al.* (2001) encontraram oito bandas únicas em cinco populações de centeio com marcadores *RAPDs* e 24 bandas únicas em oito populações com apenas seis *primers* de *ISSRs*. Por sua vez, Fernández *et al.* (2002) encontraram 15 e 34 bandas únicas com marcadores

RAPDs e *ISSRs*, respectivamente, em 14 cultivares de cevada. Mais uma vez, os marcadores *ISSRs* revelaram-se mais informativos que os marcadores *RAPDs*.

Estas bandas deverão, posteriormente, ser analisadas individualmente de forma a confirmar a sua presença/ausência em todas as plantas de uma determinada espécie/variedade/população ou se se limitam a algumas plantas e daí poder fazer a sua caracterização.

Ainda neste estudo, os *RAPDs* alcançaram uma média de 6,95 bandas polimórficas/*primer* enquanto os *ISSRs* obtiveram uma média de 9,19 bandas polimórficas/*primer*. Os *ISSRs* revelaram-se mais eficazes pelo facto de conseguirem um maior número de bandas informativas numa única amplificação. Tal facto foi, igualmente, constatado por Matos *et al.* (2001), Fernández *et al.* (2002) e Tanyolac (2003). Todos estes autores, para além de terem obtido um maior polimorfismo com os marcadores *ISSRs*, também obtiveram uma maior média de bandas polimórficas/*primer* tal qual como aconteceu neste estudo. É de notar o elevado número de bandas polimórficas/*primer* obtido pelos autores Matos *et al.* (2001): 15,25 para os marcadores *RAPDs* e 31,11 para os marcadores *ISSRs*. O mesmo aconteceu com os autores Fernández *et al.* (2002): 7,9 para os marcadores *RAPDs* e 19 para os marcadores *ISSRs*. Por sua vez, Tanyolac (2003) apenas obteve 2,04 bandas polimórficas/*primer* com os *RAPDs* e 2,75 com os *ISSRs*, valores bastante inferiores aos registados neste estudo.

Raina *et al.* (2000) obtiveram um maior número de bandas polimórficas/*primer* com os *RAPDs* (4,4) em comparação com os *ISSRs* (2,3) tendo obtido um maior polimorfismo com os marcadores *ISSRs*. Estes valores também foram inferiores aos obtidos neste trabalho.

Loarce *et al.* (1996), Persson *et al.* (2001) e Ma *et al.* (2004) que apenas utilizaram os marcadores *RAPDs* em amostras de centeio, conseguiram 2,03, 3,87 e 6,85 bandas polimórficas/*primer*, respectivamente. Apenas Ma *et al.* (2004) alcançou um número semelhante ao obtido neste estudo, tendo os restantes obtido valores bastante inferiores.

Contrariamente, Muthusamy *et al.* (2008) e Biswas *et al.* (2010) que tinham alcançado um maior polimorfismo com os marcadores *RAPDs*, também obtiveram um maior número de bandas polimórficas/*primer* com os *RAPDs*. Muthusamy *et al.* (2008), apesar de terem utilizado o dobro de *primers* com os marcadores *RAPDs*, o valor de bandas polimórficas/*primer* obtido não foi muito discrepante entre os dois marcadores: 9,71 para os *RAPDs* e 8 para os *ISSRs*. Já Biswas *et al.* (2010), alcançaram valores tão

elevados de polimorfismo com ambos os marcadores e apenas obtiveram 5,83 bandas polimórficas/*primer* com os *RAPDs* e 4,67 com os *ISSRs*.

Matos *et al.* (2001) e Fernández *et al.* (2002) utilizaram também isoenzimas nos seus estudos em centeios e cevadas, obtendo somente 26 e 33 % de polimorfismo, respectivamente. Por outro lado, Loarce *et al.* (1996), para além dos marcadores *RAPDs*, utilizaram também os marcadores *RFLPs* no seu estudo observando apenas 42 % de fragmentos polimórficos. Por sua vez, Chikmawati *et al.* (2005) necessitaram de 80 combinações de *primers* para conseguir 69,8 % de polimorfismo com marcadores *AFLPs* em estudos de relações filogenéticas entre espécies do género *Secale*. Verificou-se assim que, de facto, uma grande vantagem dos marcadores moleculares sobre os bioquímicos (isoenzimas) é a sua natureza polimórfica. Além disso, comprovou-se o elevado polimorfismo atribuído aos marcadores moleculares *RAPDs* e *ISSRs* em comparação com outros (*RFLPs* e *AFLPs*).

No entanto, os marcadores *RAPDs* e *ISSRs* também apresentam uma desvantagem comum que deve ser contornada, o seu carácter dominante. Liu *et al.* (1994) sugeriram que analisando um grande número de *loci*, através de vários *primers*, poderia aumentar o poder estatístico da técnica de *RAPDs*. Estes autores consideraram necessário a utilização de 10 a 15 *primers* (60-100 bandas polimórficas) de *RAPDs* para avaliar de forma adequada os níveis de variabilidade genética e as relações genéticas efectuadas dentro e entre *acessions* de plantas. Por seu lado, Persson *et al.* (2001) consideraram suficientes 15 *primers* de *RAPDs* com 60 bandas reprodutíveis. Neste estudo, foram utilizados 21 *primers* de *RAPDs* onde se obtiveram 242 bandas e 16 *primers* de *ISSRs* onde amplificaram 193 bandas. Isto sugere-nos que os nossos dados são suficientes para obter estimativas de diversidade genética e de distâncias entre as diferentes amostras de centeiro. Pode-se constatar que quanto maior for o número de *primers* utilizados num determinado estudo maior será a probabilidade de detectar polimorfismos de DNA e mais nos aproximamos de uma amostragem significativa do genoma.

Matos *et al.* (2001) indicaram que a combinação dos marcadores *RAPDs* e *ISSRs* produziam uma melhor estimativa para formar relações genéticas e que ambos os marcadores conseguiam produzir dendrogramas precisos caso estivessem presentes num número suficiente.

Para além da dominância, os *RAPDs* também apresentam outra desvantagem, a sua falta de reprodutibilidade. Este factor deriva da sua sensibilidade perante alterações nas condições da técnica da *PCR*. Iqbal e Rayburn (1994) e Ma *et al.* (2004) conseguiram

obter resultados bastante reprodutíveis mantendo as condições constantes. Também neste estudo se mantiveram sempre as mesmas condições de amplificação e conseguiu-se obter reprodução de resultados com eficácia, o que foi confirmado com repetições de cada reacção.

A análise de *RAPDs* e de *ISSRs* demonstraram ser métodos efectivos para detectar os níveis de polimorfismo no centeio.

5.2.2- Estudo da variabilidade genética

A variabilidade genética das plantas resulta das interacções de mutação, selecção, deriva genética aleatória e migração diferencial. A pressão mutacional e a pressão selectiva são os principais factores que vão alterando o nível do equilíbrio genético. Os isolamentos reprodutivos, ecológicos e geográficos tiveram todos efeitos marcantes nos graus de diversidade genética dentro das espécies (Max *et al.*, 1978 citado por Ma *et al.*, 2004). A diversidade genética providencia opções para desenvolver, através da selecção e do melhoramento genético, culturas novas e mais produtivas que são menos vulneráveis aos stresses bióticos e abióticos (Tanyolac, 2003; Rao, 2004). É, por isso, importante manter uma diversidade genética, principalmente nas espécies cultivadas (Tanyolac, 2003).

Existem vários tipos de marcadores eficazes para as mais diversas análises genéticas. A escolha da técnica mais apropriada para um determinado estudo não é de todo óbvia e depende, principalmente, do objectivo da pesquisa e da biologia e estrutura genética das espécies (Biswas *et al.*, 2010). Para determinar as relações genéticas entre as amostras de centeio em estudo, foram utilizados 21 *primers* de *RAPDs* e 16 *primers* de *ISSRs*, referidos anteriormente. Este tipo de marcadores origina padrões distintos de fragmentos de DNA que permitem a detecção e análise de variações a nível das sequências do DNA.

As relações genéticas entre centeios da mesma espécie e centeios de espécies diferentes ainda não foram totalmente determinadas, principalmente no que concerne as espécies silvestres. A taxonomia e a origem do género *Secale* continuam a ser temas muito controversos apesar do elevado número de estudos efectuado ao longo dos anos. Para além disso, o centeio é uma cultura de grande importância económica e que se distribui pelo mundo inteiro. Torna-se, assim, um factor determinante efectuar estudos

de variabilidade genética entre amostras diferentes de centeio a fim de obter mais dados para uma melhor caracterização das relações genéticas e um melhor conhecimento do seu genoma para questões de melhoramento. Os marcadores moleculares *ISSRs* e *RAPDs* são boas ferramentas para este tipo de abordagem derivado ao elevado grau de polimorfismo que apresentam. Tem sido descrito que a capacidade de determinar a variabilidade genética pode estar mais directamente relacionada com o número de polimorfismos encontrado do que propriamente pelo tipo de marcador escolhido (Sivaprakash *et al.*, 2004).

Foram realizados três dendrogramas: um com os marcadores *ISSRs*, outro com os marcadores *RAPDs* e um último com a combinação destes dois marcadores, utilizando o coeficiente *Simple Matching* – SM por permitir a caracterização de plantas relacionadas. Este coeficiente parece ser o mais adequado para estudos com marcadores dominantes por considerar como um factor de similaridade, tanto a presença como a ausência de bandas (Laurentin, 2009). Bolibok *et al.* (2005) demonstraram que se conseguem obter dendrogramas distintos usando marcadores, métodos estatísticos e coeficientes diferentes, o que leva a concluir que se torna vantajoso utilizar vários recursos de polimorfismo obtendo relações genéticas com diferentes marcadores e, se possível, com diferentes métodos estatísticos tornando os estudos de diversidade genética mais fiáveis.

A análise de *clusters* coloca os indivíduos em grupos numa estrutura hierárquica, onde a similaridade é máxima para os indivíduos que pertencem ao mesmo grupo e mínima para os indivíduos inseridos em grupos diferentes (Laurentin, 2009).

Os dados de ambos os marcadores (*RAPDs* e *ISSRs*) foram combinados pelo facto de formarem dendrogramas mais fiáveis, pois a informação referente à proximidade genética providenciada por um dos marcadores é reforçada pelos dados obtidos com o outro marcador. Loarce *et al.* (1996) confirmaram os seus resultados com a combinação de marcadores *RFLPs* e *RAPDs*. Matos *et al.* (2001) também confirmaram os seus dados combinando os marcadores *RAPDs* e *ISSRs* em comparação com os marcadores bioquímicos (isoenzimas).

A combinação dos dois marcadores originou um agrupamento principal (Grupo I), constituído por onze centeios e dois grupos divergentes, formados pela linha consanguínea Riodeva (Grupo II) e pelo centeio JNK (Grupo III). Dentro do grupo I, formaram-se ainda dois subgrupos (A e B).

O grupo B juntou as duas linhas da população regional de Lamego (LA1 e LA2) e a população regional de Montalegre, todas provenientes da região de Trás-os-Montes. As

variações genéticas que se observam nas populações são muito limitadas pois, durante o período de cultivo das espécies, podem ter resultado como uma adaptação às condições locais edafo-climáticas, o que pode ter resultado numa base genética restrita (Seehalak *et al.*, 2006).

No estudo de relações filogenéticas entre centeios portugueses, Matos *et al.* (2001), com os marcadores *ISSRs* e *RAPDs* combinados, também juntou no mesmo grupo as populações de Lamego e Montalegre, ficando a população Alvão separada, tal como acontece neste estudo.

Tanyolac (2003) conseguiu separar populações de cevada em dois grandes grupos conforme a sua distribuição geográfica utilizando marcadores *RAPDs* e *ISSRs*. Também Ma *et al.* (2004) conseguiram fazer agrupamentos de variedades de centeiro de acordo com as suas localizações geográficas, com marcadores *RAPDs*.

Isto vem demonstrar que, na evolução do centeiro, a diversidade genética é mais influenciada pelo isolamento temporal e ecológico do que pelo isolamento geográfico e espacial (Ma *et al.*, 2004).

O grupo A juntou três espécies/subespécies silvestres (*S. ancestrale*, *S. kuprijanovii* e *S. vavilovii*) e três cultivares (Alvão, Imperial e Dankowskie Zlote). Na figura 1.3 verificou-se que estes centeios têm centros de origem muito próximos, podendo advir daí a sua semelhança. Actualmente (GRIN, 2010, <http://www.ars-grin.gov>), o *S. ancestrale* é considerado uma subespécie do *S. cereale*, o que justifica a sua proximidade a estes cultivares. Assim como o *S. cereale*, o *S. vavilovii* também é uma espécie anual e, segundo Kush (1963), origina híbridos férteis entre elas, daí serem tão relacionadas. Contudo, assim como aconteceu neste trabalho, esta espécie tem-se revelado muito próxima da espécie cultivada (Shang *et al.*, 2006) não existindo diferenças claras entre as subespécies de *S. cereale* (De Bustos e Jouve, 2002).

O *S. kuprijanovii* é uma subespécie perene ao contrário das restantes que são anuais. No entanto, os estudos de Del Pozo *et al.* (1995) com o algoritmo UPGMA também agruparam esta subespécie com o *S. cereale*.

Akhavan *et al.* (2009) encontraram uma elevada diversidade genética dentro da espécie cultivada, podendo estar relacionada a adaptação dos cultivares a condições ecológicas diferentes. O mesmo pode suceder com a população Alvão que ficou num grupo diferente dos centeios de Lamego e Montalegre.

O *S. segetale*, assim como o *S. ancestrale*, é considerado uma subespécie do *S. cereale* e, por isso, se manteve junto das cultivares de centeiro. Na caracterização de

sequências de rDNA ITS, De Bustos e Jouve (2002) também obtiveram um *cluster* com o *S. segetale*, o *S. ancestrale* e o *S. cereale*.

O *S. montanum*, embora tenha ficado inserido dentro do grupo principal, ficou isolado mantendo o mesmo grau de similaridade com os restantes centeios. Este centeiro tem sido proposto como o antecessor directo do centeiro cultivado por alguns autores (Vences *et al.*, 1987; De Bustos e Jouve, 2002) e talvez por ser a espécie mais antiga deste estudo se tenha mantido afastada.

Akhavan *et al.* (2009) para além de agrupar o *S. ancestrale* com o *S. cereale*, também obtiveram o *S. montanum* isolado.

Os dois centeios divergentes pertencem ambos ao *S. cereale*. O Riodeva é uma linha consanguínea e talvez por este facto se afastou do resto dos centeios enquanto o JNK possui cromossomas supranumerários, os cromossomas B. Este centeiro foi o que se afastou mais das restantes amostras, provavelmente, por possuir esta característica.

Shang *et al.* (2006), através de microssatélites, obtiveram um agrupamento semelhante ao nosso grupo I, com as seguintes espécies: *S. ancestrale*, *S. cereale*, *S. segetale* e *S. vavilovii*. O *S. kuprijanovii* apareceu no *cluster* mais próximo e o *S. montanum* surgiu mais afastado.

Chikmawati *et al.* (2005), aplicando AFLPs, conseguiram separar centeios anuais dos perenes. Tal facto não aconteceu neste estudo, visto os centeios perenes (*S. montanum* e *S. kuprijanovii*) terem ficado no mesmo grupo que os anuais. No entanto, não houve diferenciação entre centeios cultivados e centeios silvestres, exactamente como neste estudo. Foi, igualmente, comprovado pelo nosso estudo que existe um grande grau de similaridade entre o centeiro cultivado e o centeiro silvestre. Foi demonstrado que tanto morfológicamente como geneticamente todos os *taxa* anuais são similares entre eles não se podendo discriminá-los (Chikmawati *et al.*, 2005).

De uma forma geral, houve uma grande semelhança entre os três dendrogramas obtidos. O mesmo aconteceu com Raina *et al.* (2001) e Kochieva *et al.* (2006). As principais diferenças entre o dendrograma obtido através dos marcadores RAPDs e o dendrograma efectuado com os marcadores ISSRs reflectiram-se nas espécies silvestres, *S. ancestrale*, *S. kuprijanovii* e *S. segetale*.

No dendrograma obtido com os RAPDs, o *S. ancestrale* agrupou com a população Alvão e a variedade Imperial, o *S. kuprijanovii* juntou-se às populações regionais portuguesas (Montalegre e Lamego) e o *S. segetale* situou-se no mesmo subgrupo da espécie selvagem *S. vavilovii*, e da variedade D. Zlote. No dendrograma dos ISSRs, o *S.*

ancestrale agrupou com o *S. kuprijanovii* embora se tenha mantido no mesmo grupo da população Alvão e da variedade Imperial e o *S. segetale* isolou-se mas manteve-se no grupo principal onde se inseriram também a espécie selvagem *S. vavilovii* e a variedade D. Zlote.

As diferenças encontradas nos dendrogramas obtidos com os dados dos *RAPDs* e dos *ISSRs* pode ser em parte explicada pelo diferente número de produtos de *PCR* analisados com cada marcador (242 *RAPDs* e 193 *ISSRs*). Isto vem reforçar a importância do número de *loci* analisados para obter relações genéticas fiáveis (Fernández *et al.*, 2002).

Os marcadores *RAPDs* e *ISSRs* podem ser efectivamente usados, tanto individualmente como combinados, para determinar relações genéticas entre genótipos de centeio.

5.3- Análise da variabilidade do gene *AACT1* (*MATE1*)

Relativamente à análise dos exões do gene *MATE* é de salientar o elevado grau de variabilidade existente nas sequências estudadas, o que confirma a potencialidade destes estudos, quer na caracterização dos mecanismos da tolerância ao alumínio, quer na análise filogenética.

O exão que apresentou maior variabilidade varia com as sequências envolvidas na comparação: o exão 1 no caso dos centeios cultivados e o exão 4 quando se analisa um representante de cada espécie do género *Secale*.

É de salientar o caso do exão 1 que apresenta uma elevada variabilidade com um elevado número de *SNPs* e o único com *INDELs*. Os *INDELs* detectados no exão 1 resultam numa alteração na proteína com a presença de mais dois aminoácidos.

Este estudo muito preliminar deve ser continuado para confirmação dos resultados obtidos, para continuar a procurar *SNPs* associados à tolerância e à sensibilidade, nestes exões e nos outros exões deste gene.

Com as sequências de todos os exões será efectuada a análise das relações filogenéticas, procurando compreender a evolução deste gene.

6- Conclusões

Este estudo confirmou a cultura em solução nutritiva como um método eficaz e rápido para avaliar a tolerância ao alumínio dos genótipos de centeio, permitindo a classificação das plantas em tolerantes ou sensíveis.

Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a metodologia aplicada para obter as duas linhas da população regional de Lamego, usadas como testemunhas, se revelou eficiente para fixar determinadas características como a sensibilidade e a tolerância ao alumínio.

Confirmou-se a elevada sensibilidade atribuída à linha consanguínea Riodeva. A variedade Dankowskie Zlote, embora seja considerada uma cultivar tolerante ao alumínio, registou valores baixos de tolerância.

O centeio JNK mostrou-se muito tolerante ao alumínio. Tal facto poderá dever-se à presença dos cromossomas supranumerários, cromossomas B, pelo que este estudo deverá ser continuado para sua confirmação.

Os centeios que cresceram ao longo dos tempos em áreas com problemas de acidez dos solos revelaram um bom comportamento à presença do alumínio. Este facto vem demonstrar que estes centeios podem ter desenvolvido mecanismos de tolerância ao alumínio e a sua importância como fonte de variabilidade genética.

De uma forma geral, as espécies/subespécies silvestres revelaram alguma tolerância ao alumínio.

Ficou confirmada a elevada tolerância que caracteriza o centeio, a uma concentração de 10 ppm de alumínio. Contudo, constatou-se uma elevada variabilidade entre as diferentes espécies e dentro da mesma espécie. Num posterior estudo, deverá avaliar-se os centeios a concentrações mais elevadas de modo a obter-se uma melhor caracterização quanto à tolerância ao alumínio.

Este germoplasma mostrou ter potencial interesse para ser utilizada em programas de melhoramento genético, seleccionando genótipos tolerantes para introgressão em espécies relacionadas.

Relativamente ao estudo da variabilidade genética através de marcadores moleculares verificou-se que os *bulks* genéticos foram úteis na determinação de relações filogenéticas e na detecção de variabilidade genética.

Os marcadores moleculares *RAPDs* e *ISSRs* evidenciaram um elevado grau de polimorfismo o que vem a comprovar a sua utilidade em estudos de diversidade genética.

A combinação dos marcadores aumentou a fiabilidade deste estudo visto haver uma maior abrangência do genoma, mais informação e os dados de ambos se complementarem.

Alguns centeios ficaram agrupados conforme a sua localização geográfica. Não houve diferenciação entre os centeios cultivados e os silvestres nem entre os centeios anuais e os perenes.

A grande variabilidade detectada nas sequências dos três exões do gene *MATE*, de plantas tolerantes e sensíveis das diferentes espécies, com a existência de vários *SNPs* e *INDELs*, confirmou a importância deste estudo e das potencialidades da análise deste gene. Estes estudos irão prosseguir com a confirmação destes resultados preliminares com a análise das sequências dos restantes exões e com estudos a nível do cDNA.

7- Bibliografia

- APA, 2010. Agência Portuguesa do Ambiente. Visitado em www.apambiente.pt. Visitado a 17 de Janeiro de 2010.
- Akhavan, A., Saeidi, H. e Rahiminejad, R.M. (2009). Genetic diversity of *Secale cereale* L. in Iran as measures using microsatellites. *Genet Resour Crop Evol* DOI 10.1007/s10722-009-9480-9.
- Almeida, L.A.V. (1955). A matéria orgânica e a calagem na fertilização da terra. *Bol. Ordem Eng.* **4** (11): 1-16.
- Altpeter, F. e Korzun, V. (2007). Rye. Em: Pua, E.C. e Davey, M.R. ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry Transgenics crops IV*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. **59**, pp. 107-117.
- Ammiraju, J.S.S., Dhollakia, D.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S. e Ranjekar, P.K. (2001). Identification of intersimple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor Appl. Genet.* **102**: 726-732.
- Andlauer, W. e Furst, P. (1999). The cereal reduce the risk of cancer? *Cereal Foods Wolrd* **44**:78-78.
- Aniol, A. (1984). Introduction of aluminum tolerance into aluminum sensitive wheat cultivars. *Z. Pflanzenzüchtg* **93**: 331-339.
- Aniol, A. (1996). Aluminium uptake by roots of rye seedlings of differing tolerance to aluminium toxicity. *Euphytica* **92**: 155-162.
- Aniol, A. (2004). Chromosomal location of aluminium tolerance genes in rye. *Plant Breed* **123**: 132-136.
- Aniol, A. e Gustafson, J.P. (1984). Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticales. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **26**: 701-705.
- Bardakci, F. (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal Biology* **25**: 185-196.
- Barkworth, M.E. e von Bothmer, R. (2009). Scientific Names in *Triticeae*. Em: Feuillet, C. e Muchlbauer, G. J. ed., *Genetics and Genomics of the Triticeae*, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. **7** pp. 3-4.
- Benito, C., Silva-Navas, J., Fontecha, G., Hernández-Riquer, M.V., Eguren, M., Salvador, N. e Gallego, F.J. (2009). From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-009-0035-9.
- Bennet, R.J. e Breen, C.M. (1991). The aluminium signal: New dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. *Plant and Soil* **134**: 153-166.
- Biswas, M.K., Xu, Q. e Deng X. (2010). Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. *Scientia Horticulturae* **124**: 254-261.
- Bolibok, H., Rakoczy-Trojanowska, M., Hromada, A. e Pietrzykowsky, R. (2005). Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereal* L.) inbred lines. *Euphytica* **146**:109-116.
- Bondia-Pons, I., Aura, A.M., Vuorel, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H. e Poutanen, K. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science* **49**: 323-336.
- Bornet, B. e Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 209-215.

- Bushuk, W. (2001). Rye Production and Uses Worldwilde. *Cereal Foods World* **46** (2): 70-73.
- Camacho, M.V., Matos, M., González, C., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O. e Benito, C. (2005). *Secale cereale* inter-microsatellites (SCIMs): Chromosomal location and genetic inheritance. *Genetica* **123**: 303-311.
- Cao, W., Scoles, G., Huel, P. e Chibbar, R.N. (1999). The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor Appl. Genet.* **98**: 602-607.
- Carvalho, A., Matos, M., Lima-Brito, J., Guedes-Pinto, H. e Benito, C. (2005). DNA Fingerprint of F1 interspecific hybrids from the *Triticeae* tribe using ISSRs. *Euphytica* **143**: 93-99.
- Carvalho, A., Lima-Brito, J. Maçãs, B. e Guedes-Pinto, H. (2009). Genetic Diversity and Variation Among Botanical Varieties of Old Portuguese Wheat Cultivars Revealed by ISSR Assays. *Biochemical Genetics* **47**: 276-294.
- Chikmawati, T., Ma, X.F., Ross, K., Miftahudin, H. e Gustafson, J.P. (2006). The genus *Secale*. Em: Kole, C. ed., *Cereals and Millets, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, vol. **1**, pp. 243-255.
- Chikmawati, T., Skovmand, B. e Gustafson, J.P. (2005). Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphisms. *Genome* **48**: 792-801.
- Collins, N.C., Shirley, N.J., Pallotta, M. e Gustafson, J.P. (2008). An *ALMT1* Gene Cluster Controlling Aluminium Tolerance at the *Alt4* Locus of Rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* **179**: 669-682.
- Cuadrado, A. e Jouve, N. (1997). Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Genome* **40**: 309-317.
- Cuadrado, A. e Jouve, N. (2002). Evolutionary Trends of Different Repetitive DNA Sequences During Speciation in the Genus *Secale*. *The American Genetic Association* **93**: 339-345.
- De Bustos, A. e Jouve, N. (2002). Phylogenetic relationship of genus *Secale* based on the characterization of rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* **235**: 147-154.
- Dedio, W., Kaltsikes, P.J. e Larter, E.N. (1969). Numerical chemotaxonomy in the genus *Secale*. *Canadian Journal of Botany* **47**: 1175-1180.
- Del Pozo, J.C., Figueiras, A.M., Benito, C. e De la Pena, A. (1995). PCR derivated molecular markers and phylogenetic relationships in *Secale* genus. *Biol. Plant* **37**: 481-489.
- Delhaize, E. e Ryan, P.R. (1995). Aluminium Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology* **107**: 315-321.
- Delhaize, E., Hebb, D. e Ryan, P. (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* **125**: 2059-2067.
- FAO, 2009. Food and Agriculture commodities productuion. Visitado em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Visitado a: 13 de Outubro de 2009.
- Fernández, M.E., Figueiras, A.M. e Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor Appl. Genet.* **104**: 845-851.
- Fontecha, G., Silva-Navas, J., Benito, C., Mestres, M.A., Espino, F.J., Hernández-Riquer, M.V. e Gallego, F.J. (2007). Candidate gene identification of na aluminium-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.) *Theor Appl. Genet.* **114**: 249-260.
- Frederiksen, S. e Petersen, G. (1997). Morphometrical analyses of *Secale* (*Triticeae*, *Poaceae*). *Nordic Journal Botany* **17**: 185-197.

- Frederiksen, S. e Petersen, G. (1998). A taxonomic revision of the genus *Secale* (Triticeae; Poaceae). *Nordic Journal Botany* **18**: 399-420.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K. e Ma, J.F. (2007). An Aluminium-Activated Citrate Transporter in Barley. *Plant Cell Physiology* **48** (8): 1081-1091.
- Gallego, F.J. e Benito, C. (1997). Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl. Genet.* **95**: 393-399.
- Gallego, F.J., Calles, B. e Benito, C. (1998a). Molecular Markers linked to the aluminium tolerance gene Alt1 in rye (*Secale Cereale* L.). *Theor Appl. Genet.* **97**: 1104-1109.
- Gallego, F.J., Lopez-Solanilla, E., Figueira, A.M. e Benito, C. (1998b). Chromosomal Location of PCR-fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. *Theor Appl. Genet.* **96**: 426-434.
- González, C., Camacho, M.V. e Benito, C. (2002). Chromosomal location of 46 new RAPD markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genetica* **115**: 205-211.
- GRIN, 2010. Germplasm Resources Information Network. Visitado em: <http://www.ars-grin.gov>. Visitado a: 13 de Fevereiro de 2010.
- Hammer, K. (1990). Breeding Sistem and Pfhhylogenetic Relationships in *Secale*. *Biol Zentralbl* **109**: 45-50.
- Hancock, J.F. (2004). Plant evolution and the origin of crop species. 2nd edition. CABI Publishing, Cambridge, USA, pp. 187-188.
- Haug, A. (1983). Molecular aspects of aluminium toxicity. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* **1**: 345-373.
- Hoekenga, O.A., Vision, T.J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H. e Kochian, L.V. (2003). Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by Quantitative Trait Locus Mapping. A Physiologically Simple But Genetically Complex Trait. *Plant Physiol.* **132**: 936-948.
- INE, 2009. Portugal Agrícola 2009. Instituto Nacional de Estatística, Portugal. Visitado em: <http://www.ine.pt>. Visitado a: 17 de Outubro de 2009.
- Iqbal, M.J. e Rayburn, A.L. (1994). Stability of RAPD markers for determining cultivar species specific DNA profiles in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* **75**: 215-220.
- Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Sasaki, R. e Ofei-Manu, P. (2000). Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* **46**: 751-758.
- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K. e Gupta, V.S. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* **77** (2):230-240.
- Jozefaciuk, G. e Szatanik-Kloc, A. (2003). Change in specific area and energy of root surface of cereal plant in Al-solution cultures. Water vapor adsorption studies. *Plant and Soil* **250**: 129-140.
- Jozefaciuk, G. e Szatanik-Kloc, A. (2004). Decrease in variable charge and acidity of root surface under Al treatment are correlated with Al tolerance of cereal plants. *Plant and Soil* **260**: 137-145.
- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L. e Zehr, V.E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* **1**: 365-373.
- Karsai, I. e Bedö, Z. (1998). Relationship between anther culture response and aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* **100**: 249-252.

- Khush, G.S. (1962). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, II. Interrelationships in the wild species. *Evolution* **16**: 484-496.
- Khush, G.S. (1963). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, IV. *Secale vavilovii* and its biosystematic status. *Z. Pflanzenzücht* **50**: 34-43.
- Khush, G.S. e Stebbins, G.L. (1961). Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*, I. Some new data on the ancestry of *S. cereale*. *Am. J. Bot.* **48**: 723-730.
- Kidd, P., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunse, B. e Barcelo, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **52**: 1339-1352.
- Kim, B.Y., Baier, A.C., Somers, D.J. e Gustafson, J.P. (2001). Aluminium tolerance in triticale, wheat and rye. *Euphytica* **120**: 329-337.
- Kochian, V.L. (1995). Cellular Mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 237-260.
- Kochian, V.L., Pence, N.S., Letham, D.L.D., Piñeros, M.A., Magalhães J.V., Hoekenga, O.A. e Garvin D.F. (2002). Mechanisms of metal resistance in plants: aluminium and heavy metals. *Plant and Soil* **247**: 109-119.
- Kochian, V.L., Hoekenga, O.A. e Piñeros, A.M. (2004). How Do Crop Plants, Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminium Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 459-493.
- Kochian, V.L., Piñeros, M.A., e Hoekenga, O.A. (2005). The physiology genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant Soil* **274**: 175-195.
- Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Legkobit, M.P. e Khadeeva, N.V. (2006) RAPD and ISSR Analyses of Species and Populations of the Genus *Stachys*. *Russian Journal of Genetics* **42 (7)**: 723-727.
- Langer, R.M.M. e Hill, G.D. (1991). *Agricultural Plants*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 40-77.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**: 277-292.
- Lefebvre, V. e Chèvre, A.M. (1995). Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* **15**: 3-19.
- Li, X.F., Ma, J.F. e Matsumoto, H. (2000). Pattern of Aluminium-Induced Secretion of Organic Acids Differs Between Rye and Wheat. *Plant Physiology* **123**: 1537-1543.
- Liu, Z.W., Jarret, R., Duncan, R.R. e Kresovich, S. (1994). Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome* **37**: 1011-1017.
- Liu, J., Magalhães, J.V., Shaff, J. e Kochian, L.V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal* **57**: 389-399.
- Loarce, Y., Gallego, R. e Ferrer, E. (1996). A comparative analysis of genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* **88**: 107-115.
- Ma, J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of Al in higher plant. *Plant Cell Physiology* **44**: 383-390.
- Ma, J.F., Zheng S.J., Li X.F., Takeda, K. e Matsumoto, H. (1997). A rapid hydroponic screening for aluminium tolerance in barley. *Plant and Soil* **191**: 133-137.

- Ma, J.F., Taketa, S., Yang, Z.M. (2000). Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiology* **122**: 687-694.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Science* **6** (6): 273-278.
- Ma, J.F. e Furukawa, J. (2003). Recent progress in the research of external Al detoxification in Higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**: 46-51.
- Ma, R., Yli-Mattila, T. e Pulli, S. (2004). Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas* **140**: 210-221.
- Ma, Z. e Miyasaka, S. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* **118**: 861-865.
- Magalhães, J., Liu, J., Guimarães C.T., Lana U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J. E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N e Kochian, L.V. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* **39**: 1156-1161.
- Matos, M. (2006). Detecção e localização de marcadores moleculares ligados a genes de tolerância ao alumínio em centeio (*Secale cereale* L.). Tese de Doutorado Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. 233 pp.
- Matos, M., Pinto-Carnide, O., Benito, C. (2001). Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* **134**: 229-236.
- Matos, M., Camacho, M.V., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O. e Benito, C. (2005). Na new aluminium gene located on rye chromosome arm 7RS. *Theor Appl. Genet.* **111**: 360-369.
- Matos, M., Pérez-Flores, V., Camacho, M.V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O., Benito, C. (2007). Detection and mapping of SSRs in rye ESTs from aluminium-stressed roots. *Molecular Breeding* **20**: 103-115.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y. e Kasai, M. (1992). Change of some properties of the plasm membrane-enhanced fraction of barley roots related to aluminium stress: membrane associated ATPase, aluminium and calcium. *Soil Science and Plant Nutrition* **38**: 411-419.
- Miftahudin, H., Scoles, G.J., e Gustafson, J.P. (2002). AFLP markers tightly linked to the aluminium-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl. Genet.* **104**: 626-631.
- Miyasaka, S. e Hawes, M. (2001). Possible Role of Root Border Cells in Detection and Avoidance of Aluminum Toxicity. *Plant Physiol.* **125**: 1978-1987.
- Mullis, K.B., Faloona, S., Scharf, R., Saiki, R., Harn, G. e Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Qunt Biol* **51**: 263-273.
- Muthusamy, S., Kanagarajan, S. e Ponnusami, S. (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology* **11** (3): 1-10.
- O'Brien, S.L. (1990). Genetics maps. Book 6. Plants Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Oram, R.N. (1996). *Secale montanum* – a wider role in Australasia? *New Zealand Journal of Agricultural Research* **39**: 629-633.
- Panda, S.K. e Matsumoto, H. (2007). Molecular Physiology of Aluminium Toxicity and Tolerance in Plants. *The Botanical Review* **73** (4): 326-347.
- Parker, D.R. e Bertsch, P.M. (1992). Formation of the “Al” tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. *Environmental Science and Technology* **26**:914-921.

- Persson, K., Diaz, O. e von Bothmer, R. (2001). Extent and patterns of RAPD variation in landraces and cultivars of rye (*Secale cereal* L.) from Northern Europe. *Hereditas* **134**: 237-243.
- Petersen, G. e Doebley, J.F. (1993). Chloroplast DNA variation in the genus *Secale* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* **187**: 115-125.
- Petersen, G., Seberg, O., Aagesen, L., e Frederiksen, S. (2004). An empirical test of the treatment of indels during optimization alignment based on the phylogeny of the genus *Secale* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**: 733-742.
- Pinto-Carnide, O. (1990). Estudos no Género *Secale*. Aspectos citogenéticos e de melhoramento. Vila Real. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, 479 pp.
- Pinto-Carnide, O., Guedes-Pinto, H. e Vaz, E. (1990). Tolerância ao alumínio de híbridos F₂ de triticales hexaploides. *Melhoramento* **32**: 285-380.
- Pinto-Carnide, O. e Guedes-Pinto, H. (1995). Cereals Aluminium Tolerance in North of Portugal. Em: Leigh, R.A. e Mechteld Blake-Kalff ed. Proceedings os the second STRESSNET conference, Salsomaggiore, Itália, pp. 269-274.
- Pinto-Carnide, O. e Guedes-Pinto, H. (1997). Screening of plants in nutrient aluminium solution. Em: Koebner, R. ed. A manual for cytogenetic techniques in cereals, John Innes Centre, Norwich, pp. 44-48.
- Pinto-Carnide, O. e Guedes-Pinto, H. (1999). Aluminium tolerance variability in rye and wheat Portuguese germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**: 81-85.
- Pinto-Carnide, O. e Guedes-Pinto, H. (2000). Differential aluminium tolerance of Portuguese rye populations and North European rye cultivars. *Agronomie* **20**: 93-99.
- Polle, E., Konzak, C.F. e Kittrick, J.A. (1978). Screening for Al tolerance in maize. Agriculture Technology for Developing Countries, Technical Series Bulletin, 22. pp. 12.
- Prevost, A. e Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 107-112.
- Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P. e Devarumath, R.M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* **44**: 763-772.
- Rakowska, M. (1996). The nutritive quality of rye. *Vortr Pflanzenzucht* **35**: 85-95.
- Rao, N. (2004). Plant genetic resources: advancing conservation and use through. *African Journal of Biotechnology* **3** (2): 136-145.
- Reddy, P., Appels, R. e Baum, B.R. (1990). Ribosomal DNA spacer-length variation in *Secale* spp. (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* **171**: 205-220.
- Reddy, M.P., Sarla, N. e Siddiq, E.A. (2002). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9-17.
- Rohlf, M. (1998). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02i. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Setauket, NY.
- Roshevitz, R.I. (1947). Monographie of the genus *Secale* L. Trudy Bot. Inst. Akad. Nauk SSSR, ser. 1, Fl. Sist. Vyss. Rast. **6**: 105-163.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J. e Delhaize, E. (2009). A Second Mechanism for Aluminium Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots. *Plant Physiology* **149**: 340-351.

- Samac, D.A. e Tesfaye, M. (2003). Plant improvement for tolerance to aluminium in acids soils – a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **75**: 189-207.
- Santos, E. (2006). Traceabilidade em azeites portugueses com recurso a marcadores moleculares. Relatório de estágio da Licenciatura em Biologia – Ramo Científico. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 68 pp.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E. e Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding aluminium activated malate transporter. *Plant J.* **37**: 645-653.
- Schlegel, R. e Pohler, W. (1994). Identification of an A-B chromosome translocation in diploid rye (*Secale cereale* L.). *Breeding Science* **44**: 279-283.
- Schulman, A.H. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* **158**: 313-321.
- Seehalak, W., Tomooka, N., Waranyuwat, A., Thipyapong, P., Laosuwan, P., Kaga, A. e Vaughan, D. A. (2006). Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighbouring regions revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* **53** (5): 1043-1059.
- Sencer, H.A. e Hawkes, J.G. (1980). On the origin of cultivated rye. *Biol. J.Linn. Soc.* **13**: 299-313.
- Shang, H., Wei, Y., Wang, X. e Zheng, Y. (2006). Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* **29** (4): 685-691.
- Silva-Navas, J., Benito, C., Téllez-Robledo, B., Abdl-Moneim, D. e Gallego, F.J. (2010). The *ScAAT1* (*ScMATE1*) gene at the *Qalt5* locus contributes to aluminum tolerance in the rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* (in press).
- Sivaprakash, K.R., Prasanth, S.R., Mohanty, B.P. e Parida, A. (2004). Genetic diversity of black gram landraces as evaluated by AFLP markers. *Current Science* **86** (10): 1411-1415.
- Ślaski, J. (1994). Differences in the metabolic responses of root tips of wheat and rye to aluminium stress. *Plant and Soil* **167**: 165-171.
- Stutz, H.C. (1972). On the origin of cultivated rye. *American Journal Botany* **59**: 59-70.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Tanyolac, B. (2003). Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**: 611-614.
- Taylor, G.J. (1991). Current views of the aluminium stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **10**: 57-93.
- Vaillancourt, A., Nkongolo, K.K., Michael, P. e Mehes, M. (2008). Identification, characterization, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. *Euphytica* **159**: 297-306.
- Vavilov, N.I. (1917). On the origin of cultivated rye. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed* **10**: 561-590.
- Vavilov, N. (1926). Studies of the origin of cultivated plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed* **16** :1-248.
- Vences, F.J., Vaquero, F. e Pérez de la Vega, M. (1987). Phylogenetic relationships in *Secale* (*Poaceae*): an isozymatic study. *Plant Syst* **157**: 33-47.

- Virk, P.S., Zhu, J., Newbury, H.J., Bryan, G.J., Jackson, M.T. e Ford-Lloyd, B.V. (2000). Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* **112**: 275-284.
- Von Uexküll, H.R. e Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* **171**: 1-15.
- Wang, R.C., Bothmer, R., von Dvorak, J., Fedak, G., Linde-Laursen, I. e Muramatsu, M. (1996). Genome symbols in the *Triticeae* (*Poaceae*). Em: Wang, R.R.C., Jensen, K.B. e Jaussi, C. ed., Proceedings of the 2nd international Triticeae symposium. Utah State University Press. Utah, USA. pp. 29-34.
- Wang, J., Raman, H., Zhang, G., Mendham, N. e Zhou M. (2006). Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) physiological mechanisms, genetics and screening methods. *Journal of Zhejiang University Science B* **7** (10): 769-787.
- Williams, J.G. K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. e Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22): 6531-6535.
- Yang, W., de Oliveira, A.C., Godwin, I., Schertz, K. e Bennetzen, J.L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in sorghums. *Crop Science* **36**: 1669-1676.
- Yang, Z., Sivaguru, M., Horst, W. e Matsumoto, H. (2000). Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycinemax*). *Physiol Plant.* **110**: 72-77.
- Yokosho, K.A., Yamaji, N. e Ma J.F. (2010). Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Functional Plant Biology*, **37**: 296-303.
- Yu, L.X e Nguyen, H.T. (1994). Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **87**: 668-672.
- Zhao, Z.Q., Ma, J.F., Sato, K. e Takeda, K. (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, **217** (5):794-800.
- Zheng, S., Ma, J. e Matsumoto, H. (1998). Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Physiol Plant.* **103**: 209-214.
- Zhou, L., Bai, G., Carver, B. e Zhang D. (2007). Identification of new sources of aluminium resistance in wheat. *Plant Soil* **297**: 105-118.
- Zhukovsky, P.M. (1933). Roggen. Vsesoiuzn. akad. selsk. khoz. nauk lenina, Ins. Rasteniievod. Leningrad.
- Zhukovsky, P.M. (1928). A new wild growing form of rye in Anatolia. *Bull. Appl. Bot.* **19**: 49-52.
- Zieliński, H., Ceglińska, A. e Michalska, A. (2007). Antioxidant contents and properties as quality indices of the rye cultivars. *Food Chemistry* **104**: 980-988.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. e Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR-Anchored) polymerase shine reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.
- Zohary, D. (1971). Origin of southwest Asiatic cereals: wheats, barley, oats and rye. Em: Davis, P. H., Harper, P.T. e Hedge, I. ed., Plant life of south-west Asia. Botanic Society Edinburgh. pp. 235-260.
- Zohary, D. e Hopf, M. (2000). Domestication of plants in the Old World. 3rd ed. Oxford University Press, New York, pp. 69-72.